

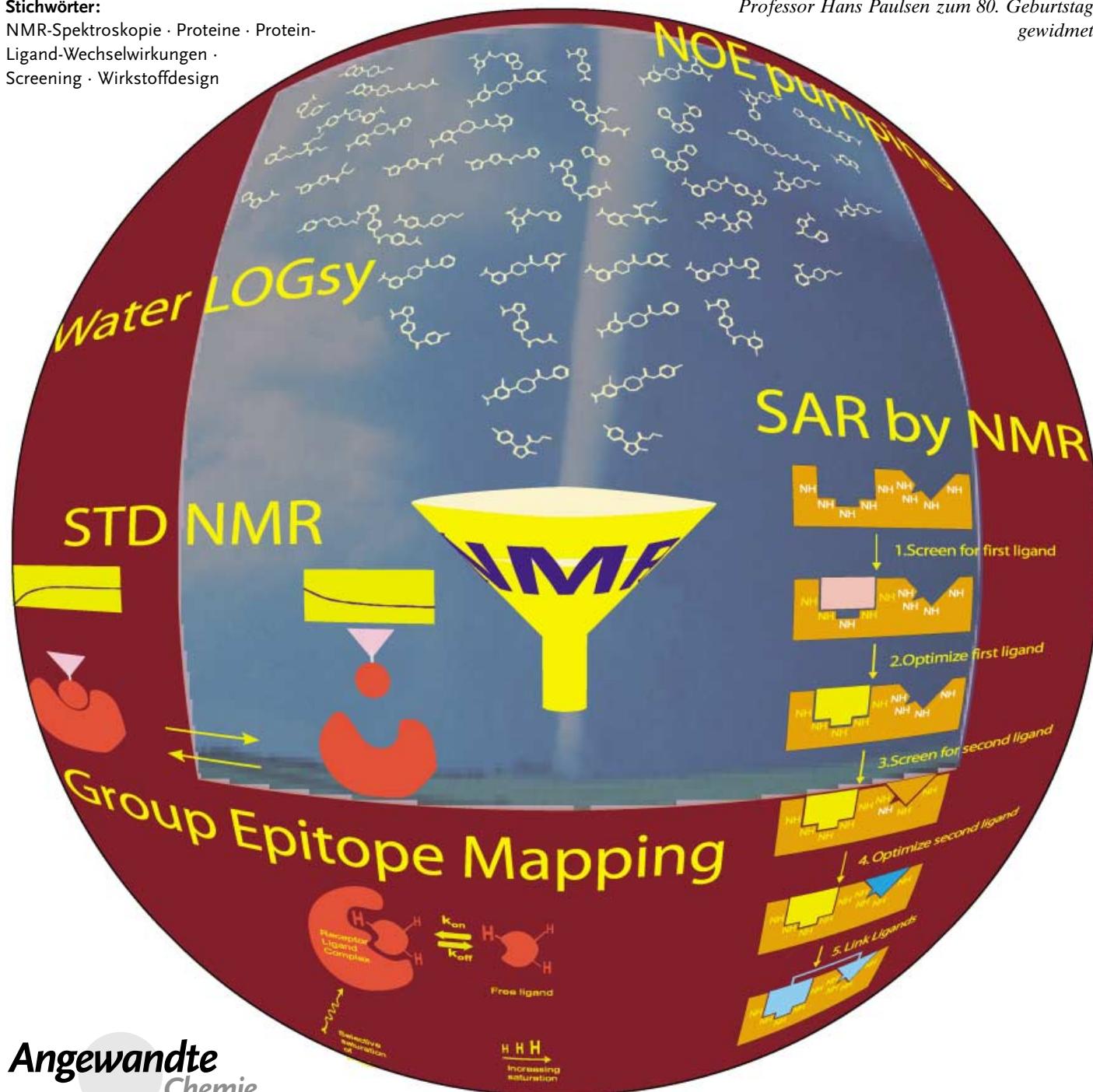
# NMR-Techniken zum Screening und zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteinrezeptoren

Bernd Meyer\* und Thomas Peters\*

**Stichwörter:**

NMR-Spektroskopie · Proteine · Protein-Ligand-Wechselwirkungen · Screening · Wirkstoffdesign

Professor Hans Paulsen zum 80. Geburtstag  
gewidmet



**E**rkennnisse über Bindungsvorgänge zwischen Liganden und Rezeptoren sind der Schlüssel zu einem Verständnis biologischer Prozesse. Seit kurzem ist es möglich, durch neue NMR-spektroskopische Techniken Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf atomarer Ebene zu verstehen. Diese Experimente charakterisieren die Bindungsvorgänge entweder von der Seite des Liganden oder von der des Proteins. Idealerweise werden beide Techniken gemeinsam angewendet und liefern dann ein komplettes Bild der Ligandenbindung an einen Rezeptor. Die in diesem Aufsatz vorgestellten Ansätze erlauben das Screening von Verbindungsbibliotheken genauso wie eine detaillierte Charakterisierung von Bindungsepitopen und einzelnen funktionellen Gruppen, die in die Bindungsvorgänge involviert sind. Die Bestimmung der Bindungsstärke und der Bindungskinetik ist ebenso möglich wie die Untersuchung kompetitiver Bindung, allosterischer Effekte oder der Bindung von Liganden an intakte Viren und membranständige Proteine.

## 1. Einleitung

Die biologische Funktion eines Proteins hängt im Allgemeinen von der Wechselwirkung mit seinen Ligandenmolekülen ab. Beispiele sind die Wechselwirkung von Hormonrezeptoren mit Hormonen, die komplizierte Signalkaskaden auslösen, die Wechselwirkung von Proteinen mit Oligonucleotiden, die die Replikation, die Transkription oder die Translation regulieren, oder aber die hochspezifische Wechselwirkung von Zelloberflächen-Antigenen mit Rezeptoren, die sich auf anderen Zellen befinden. Dies ist nur ein kurzer, willkürlicher Ausschnitt aus der Vielfalt an Möglichkeiten. Es ist offensichtlich, dass man zum Verständnis biologischer Funktion eine möglichst präzise Beschreibung der Protein-Ligand-Interaktionen auf atomarer Ebene benötigt. Daher sind viele Versuche unternommen worden, diese Prozesse mit biophysikalischen Methoden zu charakterisieren.

Von besonderem Interesse sind hierbei natürlich solche Protein-Ligand-Wechselwirkungen, die eine Schlüsselrolle bei der Entstehung schwerer Krankheiten wie Aids oder Krebs spielen. Das Verständnis der Prinzipien, nach denen ein Protein-Rezeptor mit biologischen, d.h. natürlichen Liganden wechselwirkt, erlaubt die Entwicklung wirksamerer Substanzen, die als Wirkstoffkandidaten für neue Pharmaka dienen können. Die Identifizierung und Optimierung solcher Kandidaten zur Medikamentenentwicklung ist normalerweise eine sehr zeitaufwendige Aufgabe und umfasst mehrere Schritte. Ein wesentlicher Schritt ist die Identifizierung von Substanzen mit Bindungsaktivität für den interessierenden Proteinrezeptor, um so genannte Leads oder Leitsubstanzen zu generieren. Der Entwicklungsprozess erfordert das Screening einer sehr großen Zahl von Verbindungen – häufig mehr als  $10^6$ . Klassisch wird dieser Screeningprozess mit biologischen oder funktionalen Assays wie dem „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt. Kürzlich hat sich gezeigt, dass eine Anzahl neuartiger NMR-Techniken Informationen über den Bindungsprozess auf atomarer Ebene liefert, die eine Identifizierung neuer bioaktiver Verbindungen ermöglichen. Da diese Verfahren zunehmend

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	891
<b>2. Der Transfer-NOE-Effekt zur Detektion und Charakterisierung der Bindung von Liganden</b>	892
<b>3. Änderung der chemischen Verschiebungen zur Identifizierung der Ligandenbindung an Rezeptoren</b>	908
<b>4. Relaxationszeiten zur Identifizierung von Ligandenbindung</b>	913
<b>5. Diffusion zur Identifizierung von Ligandenbindung</b>	914
<b>6. Bedingungen für das NMR-Screening und die Charakterisierung der Ligandenbindung</b>	915

bedeutsamer werden, sind in den letzten Jahren zu diesem Thema einige Übersichtsartikel mit unterschiedlichem Fokus publiziert worden.<sup>[1-13]</sup> Dieser Aufsatz soll einen zusammenfassenden Überblick über die verschiedenen NMR-Verfahren geben, mit denen es möglich ist, Bindungsaktivität zu identifizieren und zu charakterisieren. Weitergehende Schritte, die die Analyse der bioaktiven Konformationen der Liganden und die Bestimmung des Bindungsepitops der Liganden umfassen, werden ebenfalls behandelt.

Theoretisch können alle NMR-Verfahren als Maß für die Bindungsaktivität von Liganden an ein Protein genutzt werden. In der Praxis hingegen sind nur diejenigen Parameter bedeutsam, die leicht bestimmt werden können und mit denen eine hohe Empfindlichkeit assoziiert ist. Dies sind z.B. Änderungen von chemischen Verschiebungen, Relaxationszeiten, Diffusionskonstanten, NOEs oder Austausch von Sättigung. Es existieren im Wesentlichen zwei Ansätze: Der erste basiert auf Effekten, die an NMR-Signalen der Liganden gemessen werden und beruht damit typischerweise auf NOE-Effekten zwischen Protein und Ligand (Abschnitt 2). Der zweite Ansatz konzentriert sich auf Änderungen der chemischen Verschiebungen des Zielproteins bei der Bindung

[\*] Prof. Dr. B. Meyer  
Institut für Organische Chemie  
Universität Hamburg  
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)  
Fax: (+ 49) 40-42838-2878  
E-mail: bernd.meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de  
Prof. Dr. T. Peters  
Institut für Chemie  
Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)  
Fax: (+ 49) 451-500-4241  
E-mail: thomas.peters@chemie.mu-luebeck.de

von Liganden (Abschnitt 3). Wie im Folgenden gezeigt wird, sind die beiden Ansätze komplementär und haben unterschiedliche Vorteile. Weitere Ansätze nutzen Änderungen im Relaxations- oder Diffusionsverhalten der Liganden bei der Bindung an ein Protein (Abschnitte 4 und 5).

## 2. Der Transfer-NOE-Effekt zur Detektion und Charakterisierung der Bindung von Liganden

NOE-Effekte (NOEs) sind sehr nützlich zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Molekülen in Lösung.<sup>[14]</sup> Insbesondere zur Strukturanalyse von Proteinen hat sich diese Methode sehr bewährt.<sup>[15-20]</sup> NOEs ändern sich drastisch bei der Bindung von Ligandenmolekülen an Rezeptorproteine, was zur Beobachtung so genannter Transfer-NOE-Effekte (trNOEs) führt. Diese Änderungen sind die Basis für eine Vielzahl von Experimenten, mit denen die Ligandenbindung detektiert und charakterisiert werden kann.

Die Theorie des trNOE wurde bereits vor mehr als 20 Jahren beschrieben.<sup>[21-25]</sup> Sie hat seitdem breiten Nutzen bei der Bestimmung der 3D-Struktur von Liganden, die an Rezeptorproteine gebunden sind, erfahren.<sup>[26-30]</sup> Die Beobachtung von trNOEs beruht auf unterschiedlichen Korrelationszeiten  $\tau_c$  des freien und des gebundenen Moleküls. Moleküle mit niedrigen oder mittleren Molekulargewichten ( $M_w < 1000-2000$ ) haben eine kurze Korrelationszeit  $\tau_c$ . Als Konsequenz werden solche Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Gestalt, vom Molekulargewicht und der Magnetfeldstärke positive NOEs, keine NOEs oder sehr kleine negative NOEs zeigen. Große Moleküle liefern hingegen stark negative NOEs. Wenn nun ein kleines Molekül (der Ligand) an ein großes Molekül (den Proteinrezeptor) bindet, verhält es sich als Teil des großen Moleküls und übernimmt dessen NOE-Verhalten, d.h., es zeigt stark negative NOEs, die so genannten trNOEs. Diese trNOEs werden in Lösung gemessen und reflektieren die Konformation des gebundenen Liganden. Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor kann daher leicht identifiziert werden, indem man das Vorzeichen und die Größe der beobachteten NOEs bestimmt. Eine Unterscheidung von trNOEs, die aus dem gebundenen Zustand herrühren, und NOEs, die vom Liganden in Lösung

herrühren, gelingt über die Aufbaugeschwindigkeit der maximalen Intensität der Effekte. Für trNOEs liegt diese im Bereich von 50–100 ms, wohingegen die freier Moleküle in Lösung 4–10 Mal größer ist. Daher kann für trNOEs die maximale Verstärkung bei wesentlich kürzeren Mischzeiten  $\tau_{\text{Mix}}$  beobachtet werden als bei kleinen Molekülen, die sich isoliert in Lösung befinden. Verschiedene experimentelle Implementierungen sind in den letzten zwei Jahrzehnten beschrieben worden, die vom eindimensionalen selektiven Steady-State-Experiment bis zu ein- und zweidimensionalen NOE-Experimenten reichen. Außerdem sind mehrere Verfahren zur quantitativen Interpretation von trNOEs entwickelt worden, die damit verlässlichere Informationen über die Konformation des gebundenen Liganden liefern.<sup>[26, 27, 30]</sup>

Man unterscheidet generell zwischen inter- und intramolekularen trNOEs. Die intramolekularen trNOEs werden zur Charakterisierung der Konformation des gebundenen Liganden genutzt. Intermolekulare trNOEs zwischen dem Liganden und dem Rezeptorprotein erlauben prinzipiell, die Orientierung des gebundenen Liganden in der Bindungsschale des Proteins zu bestimmen.<sup>[31, 32]</sup> Im Folgenden werden auf trNOEs beruhende Verfahren vorgestellt, die zur Detektion und Charakterisierung der Bindungsaktivität in kombinatorischen Bibliotheken entwickelt wurden.

### 2.1. Sättigungs-Transfer-Differenz(STD)-NMR-Experimente

Sättigungs-Transfer-NMR-Spektroskopie wird seit vielen Jahren genutzt, um die Bindung in stark assoziierten Rezeptor-Ligand-Komplexen zu charakterisieren. Falls ein Ligand für den gebundenen und den freien Zustand wegen des langsamen Austausches zwei getrennte Signalsätze zeigt, ist ein Transfer der Sättigung zwischen dem freien und dem gebundenen Zustand möglich. Durch Sättigung z.B. der Signale des freien Liganden können diejenigen des gebundenen Liganden identifiziert werden. Neben der Zuordnung der Signale des gebundenen Liganden ist es möglich, mithilfe des Sättigungstransfers auch die Bindungskinetik von Ligand-Protein-Komplexen zu analysieren.<sup>[33-51]</sup>

Dieses Verfahren wurde auch zur Analyse der Bindung von Kohlenhydratliganden an Proteine verwendet.<sup>[52, 53]</sup> Das



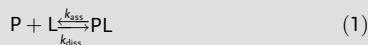
Bernd Meyer promovierte 1979 an der Universität Hamburg in Chemie. Nach einem Aufenthalt als Postdoc bei Prof. K. Bock an der Technischen Universität Lyngby habilitierte er sich 1986 an der Universität Oldenburg. Danach ging er als Assistant Professor an das Complex Carbohydrate Research Center in Athens wo er 1992 Associate Professor wurde. 1993 folgte er einem Ruf an die Universität Hamburg. Seine Forschungsinteressen umfassen die NMR-Analyse von Glycoproteinen, Screening kombinatorischer Bibliotheken auf Bindungsaffinität, rationales Design von Liganden und Inhibitoren für Proteinrezeptoren und die HIV-Infektion.



Thomas Peters promovierte 1986 an der Universität Hamburg in Chemie. Er war danach Postdoc bei Prof. D. R. Bundle am National Research Council in Ottawa. 1993 habilitierte er sich an der Universität Frankfurt für das Fach Biophysikalische Chemie. Seit 1994 ist er Professor an der Medizinischen Universität Lübeck. Mit Schwerpunkt NMR-Spektroskopie beschäftigt er sich mit der theoretischen und experimentellen Bestimmung der 3D-Struktur von Oligosacchariden, der Untersuchung der Ligandenbindung an native Viren und der Analyse viraler Systeme.

**Kasten 1: Kinetik und Thermodynamik der Bindung kleiner Moleküle an große Rezeptorproteine – Relevanz für NMR-Bindungsexperimente**

In ihrer einfachsten Form folgt die Bindung kleiner Moleküle an große Rezeptorproteine als bimolekulare Assoziation einer Kinetik zweiter Ordnung. Zwischen einem Liganden L, einem Rezeptorprotein P und dem Komplex PL existiert das Gleichgewicht (1) mit den



Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  für die Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeit. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wird beschrieben durch Gleichung (2).

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{diss}}{k_{ass}} \quad (2)$$

Schätzwerte für  $k_{diss}$  lassen sich erhalten, wenn man eine diffusionskontrollierte Assoziationsreaktion annimmt, bei der  $k_{ass}$  ungefähr  $10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  beträgt. Damit lassen sich Dissoziationsgeschwindigkeiten berechnen, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind.

**Tabelle 1:**

$K_D$	$k_{diss} [\text{s}^{-1}]$
1 $\text{mM}$	10000
1 $\mu\text{M}$	10
1 $\text{nM}$	0.01

Allerdings kann  $k_{ass}$  im Bereich zwischen  $10^4$  und  $10^{11}$  variieren, was zu Änderungen der Dissoziationsgeschwindigkeit um mehr als sieben Größenordnungen führen kann. Die Assoziationsgeschwindigkeit ist typischerweise klein, wenn bei der Bindung umfangreichere konformative Änderungen entweder des Liganden oder des Rezeptors stattfinden. Dissoziationsgeschwindigkeiten größer als  $10^7 \text{ s}^{-1}$  findet man für sehr kleine Liganden, z. B.  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

Schätzwerte für  $k_{diss}$  sind wichtig für die Interpretation von NMR-Bindungsexperimenten (siehe Kasten 5). Hierbei können verschiedene Randbedingungen gefunden werden:

a) schneller Austausch auf der Zeitskala der chemischen Verschiebung [Gl. (3)]

$$k_{diss} \gg \omega \quad (3)$$

b) mittelschneller Austausch auf der Zeitskala der chemischen Verschiebung [Gl. (4)]

$$k_{diss} \approx \omega \quad (4)$$

enorme Potenzial des Sättigungs-Transfer-NMR-Experiments wird jedoch erst seit kurzem beim Screening auf Bindungsaktivität von Mischungen verschiedener Verbindungen genutzt. Wir haben ein Verfahren entwickelt, das auf dem Transfer von Sättigung vom Protein zum gebundenen Liganden hin beruht, wobei die Sättigung durch chemischen Austausch in die Lösung gebracht und dort detektiert wird (Abbildung 1, Schema 1).<sup>[54,55]</sup> Die Methode der Differenzspektroskopie kann auch leicht bei homonuklearen Experimenten, insbesondere Protonen-NMR, angewendet werden, um sehr gut aufgelöste Spektren vom Liganden allein zu erhalten. Subtraktion eines Spektrums mit Sättigung der Proteinkerne von einem ohne liefert ein Differenzspektrum, in dem nur die Signale des oder der Liganden übrig bleiben.

c) langsamer Austausch auf der Zeitskala der chemischen Verschiebung [Gl. (5)]

$$k_{diss} \ll \omega \quad (5)$$

Mit  $\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu$  als der chemischen Verschiebungsdifferenz [Hz] der Signale im gebundenen und freien Zustand. „Austausch“ bezieht sich hierbei auf den Wechsel zwischen freiem und gebundenem Zustand des Liganden. Bei NMR-Bindungsexperimenten, die auf chemischen Verschiebungsdifferenzen basieren, wie Struktur-Wirkungs-Beziehungen durch Kernspinresonanz (SAR by NMR), kann die Region des mittelschnellen Austausches schon bei  $K_D$ -Werten im mikromolaren Bereich erreicht werden, wobei dies von der erwarteten chemischen Verschiebungsdifferenz abhängt. Wenn beispielsweise eine chemische Verschiebungsdifferenz von  $\Delta\nu = 20 \text{ Hz}$  für die Kerne des freien und gebundenen Liganden beobachtet wird, dann ist  $K_D = 12 \mu\text{M}$  entsprechend einem  $k_{diss}$ -Wert von  $125 \text{ s}^{-1}$ . Der Austausch verläuft mittelschnell und führt damit zu sehr breiten und wenig intensiven Signalen.

Bei größeren  $k_{diss}$ -Werten liegen die Signale bei einer chemischen Verschiebung entsprechend dem gewichteten Mittelwert der chemischen Verschiebungen der Kerne des freien und gebundenen Liganden. Bei kleineren  $k_{diss}$ -Werten werden zwei separate Signalsätze für die Kerne des freien und gebundenen Liganden beobachtet.

In vielen Fällen ist es wichtig, den Bruchteil der Moleküle abzuschätzen, die an das Rezeptorprotein gebunden sind. Mit  $[P]_0$  und  $[L]_0$  als Gesamtkonzentrationen von Protein bzw. Ligand kann man Gleichung (2) in eine quadratische Gleichung überführen, deren Lösung in Gleichung (6) gegeben ist.

$$[PL] = 1/2(K_D + [P]_0 + [L]_0) - \sqrt{1/4(K_D + [P]_0 + [L]_0)^2 - [L]_0[P]_0} \quad (6)$$

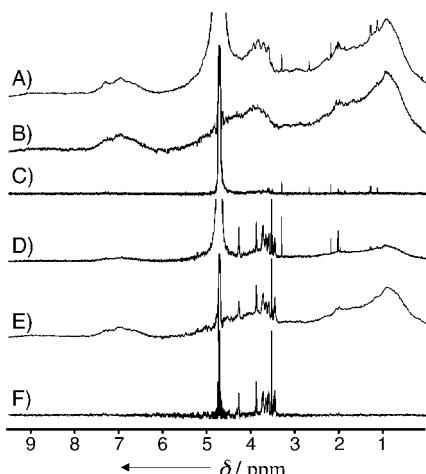
Bei vorgegebenen Konzentrationen  $[L]_0$  und  $[P]_0$  und einem gegebenen Wert für  $K_D$  ist die aktuelle Konzentration des Komplexes PL durch Gleichung (6) gegeben. Hieraus lässt sich der Bruchteil des gebundenen Liganden als  $f_{LB}$  durch Gleichung (7) und der des gebundenen Proteins  $f_{PB}$  durch Gleichung (8) berechnen. Der Bruchteil

$$f_{LB} = [PL]/[L]_0 \quad (7)$$

$$f_{PB} = [PL]/[P]_0 \quad (8)$$

$f_{LB}$  ist für die Abschätzung der Linienbreite der Ligandensignale wichtig. Der Bruchteil  $f_{PB}$  wird herangezogen, um die Verfügbarkeit freier Bindungsstellen für Kompetitionsstudien zu errechnen.

Die Einstrahlrate für die Sättigung der Proteinkerne wird dabei auf einen Wert gesetzt, bei dem nur Resonanzen der Kerne des Proteins und keine des Liganden auftreten. Daher werden im „On-Resonance“-Experiment selektiv nur Signale der Proteinkerne gesättigt. Typischerweise werden für die On-Resonance-Einstrahlung Frequenzen im Bereich von ungefähr  $-1 \text{ ppm}$  verwendet, da hier keine Ligandenresonanzen auftreten, während durch die große Linienbreite der Proteinsignale immer noch eine selektive Anregung von Proteinsignalen möglich ist. Falls der Ligand keine Signale im Bereich aromatischer Protonen hervorruft, kann die Sättigungsfrequenz auch in diesem Bereich platziert werden. Im Tieffeldbereich bei  $\delta = 11$  oder  $12 \text{ ppm}$  ist ebenfalls eine Anregung der Proteinkerne möglich. Um die gewünschte

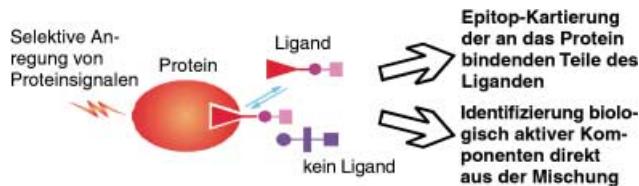


**Abbildung 1.** A) Das Referenz-1D-NMR-Spektrum des 120 kDa großen Proteins  $\text{RCA}_{120}$  (Konzentration der Bindungsstellen  $50 \mu\text{M}$ ) zeigt die sehr breiten Linien, die für ein Protein dieser Größe charakteristisch sind. Die wenigen scharfen Resonanzlinien sind auf Verunreinigungen zurückzuführen. B) Das entsprechende STD-NMR-Spektrum zeigt, dass durch Einstrahlung bei  $-2 \text{ ppm}$  das gesamte Protein durchgehend gesättigt werden kann. Diese Bedingungen können daher sehr effizient für den Einsatz der STD-NMR-Spektroskopie genutzt werden. Man kann weiterhin sehen, dass die Verunreinigungen, die im Spektrum A sichtbar waren, durch die Differenzbildung im STD-Spektrum nicht mehr zu sehen sind. C) 1D-NMR-Spektrum, das mit einem  $T_{1\rho}$ -Filter aufgenommen worden ist ( $30 \text{ ms}$  Spinlock-Puls). Dieser Filter wird eingesetzt, um breite Resonanzlinien des Proteins aus dem Differenzspektrum zu entfernen. Es sind nur die Resonanzen der niedrigmolekularen Verunreinigung im Spektrum zu sehen. D) Referenz-1D-NMR-Spektrum von  $\text{RCA}_{120}$  (Konzentration der Bindungsstellen  $40 \mu\text{M}$ ) in Gegenwart von  $1.2 \text{ mM}$   $\beta$ -D-GalOMe ohne  $T_{1\rho}$ -Filter. E) Entsprechendes STD-NMR-Spektrum, das nur Signale vom  $\beta$ -D-GalOMe zeigt und damit klar belegt, dass diese Verbindung an den Rezeptor bindet. F) STD-Spektrum wie in E) jedoch mit  $T_{1\rho}$ -Filter, der alle Protein-Hintergrundsignale entfernt.

Selektivität zu erhalten und um die Anregung durch Seitenbanden zu vermeiden, werden so genannte „Shaped Pulses“ für die Sättigung der Proteinerkerne eingesetzt (Abbildung 2).

Ein wesentlicher Vorteil der neuen STD-Technik ist, dass sie mit jeder anderen beliebigen NMR-Pulssequenz kombiniert werden kann, sodass alle NMR-Experimente auch als STD-Variante zur Verfügung stehen, z.B. STD-TOCSY oder STD-HSQC.<sup>[54,56]</sup> Das STD-Experiment wurde zuerst eingesetzt, um die Komponenten einer Kohlenhydrat-Bibliothek auf ihre Bindungsaktivität mit einem Kohlenhydrat-bindenden Protein, dem Weizenkeim-Agglutinin (Wheat Germ Agglutinin, WGA), hin zu untersuchen. Zur selben Zeit wurde gezeigt, dass STD-NMR-Spektroskopie eine präzise Bestimmung des Ligandenbindungsseptops erlaubt. Eine Kenntnis des Bindungsseptops auf dem Liganden ist eine wesentliche Voraussetzung für die gezielte Entwicklung neuer Medikamente.<sup>[54]</sup> Dies wird detaillierter in Abschnitt 2.1.4 behandelt.

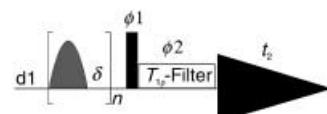
Im Folgenden sei das prinzipielle Vorgehen bei der STD-NMR-Spektroskopie erläutert.<sup>[54]</sup> In einer Lösung bestehend aus dem Rezeptorprotein und zugefügtem Liganden werden die Proteinerkerne in einem  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment selektiv bei



**Schema 1.** Schematische Darstellung der STD-NMR-Spektroskopie. Wird ein Protein gesättigt, so sind die Liganden, die sich im Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand befinden, während ihrer Kontaktzeit mit dem Protein ebenfalls der Sättigung unterworfen. Durch den Austausch wird diese Sättigung in die Lösung transportiert, wo sie detektiert wird. Durch Subtraktion dieses Spektrums von einem Spektrum, in dem das Protein nicht gesättigt wurde, erhält man ein NMR-Spektrum, in dem nur noch Signale von Molekülen, die an das Protein gebunden waren, sichtbar sind. Nicht bindende Moleküle werden in diesem Spektrum nicht mehr beobachtet. Das Rezeptorprotein wird mithilfe eines selektiven Pulses gesättigt. Im Allgemeinen wird eine Kaskade von Gauß-Pulsen verwendet. Die Dauer der Sättigungszeit liegt typischerweise zwischen 1 und 2 s. Der Ligand liegt normalerweise in einem ca. 100fachen Überschuss gegenüber dem Protein vor, so dass Proteinkonzentrationen im unteren  $\mu\text{M}$  Bereich ausreichend sind.

einer Frequenz gesättigt, die mindestens 700 Hz von der nächsten Ligandenfrequenz entfernt ist („On-Resonance“-Experiment). Solche Regionen sind in Abhängigkeit von der Natur der Liganden sehr einfach zu finden. Bei 500 MHz wird normalerweise eine Einstrahlfrequenz von  $-1.5 \text{ ppm}$  gewählt. Obwohl die Einstrahlung hochselektiv ist und nur eine Bandbreite von wenigen Hz aufweist, erhält man bei einem Makromolekül dennoch eine komplette Sättigung aller Proteinprotonen (im Folgenden als „gesättigtes Protein“ bezeichnet) durch effiziente Spindiffusion innerhalb von 50–200 ms.

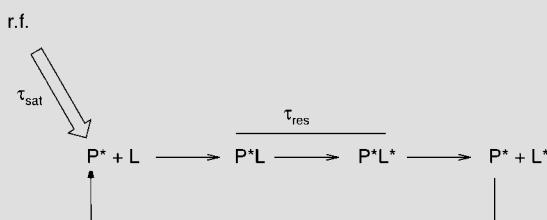
Liganden, die an das Protein binden, werden während der Bindung ebenfalls gesättigt. Der Grad der Sättigung der Ligandenprotonen hängt offensichtlich von der Verweilzeit des Liganden in der Proteinbindungstasche ab. Durch Dissoziation des Liganden wird diese Sättigung in die Lösung übertragen, in der der freie Ligand wiederum schmale Linien zeigt. Für Ligandenprotonen, die mit Proteinprotonen über einen intermolekularen trNOE wechselwirken, nimmt die Intensität der Signale ab. Normalerweise ist es jedoch nicht möglich, diese Abnahme der Intensität in Gegenwart des



**Abbildung 2.** Pulssequenz für 1D-STD-NMR-Experimente. Die Differenzbildung erfolgt über den Phasenzyklus nach jedem Scan. Die On-Resonance- und Off-Resonance-Frequenzen der selektiven Pulse liegen bei  $-0.4$  und  $30 \text{ ppm}$ . Die Pulsphasen sind  $\phi_1 = (X, -X, -X, X, Y, -Y, -Y, -X, X, X, -X, -Y, Y, -Y)$ ,  $\phi_2 = 2(Y, -Y, 2(-X, X))$  und  $\phi_{\text{Rec}} = 2(X), 2(-X), 2(Y), 2(-Y), 2(-X), 2(X), 2(-Y), 2(Y)$ . Die Länge des selektiven Pulses ist 50 ms und der Delay  $\delta$  zwischen den Pulsen beträgt 1 ms. Die Zeit für die Vorsättigung wird justiert, indem die Anzahl der Pulse  $n$  (typisch ist  $n = 40$ ) verändert wird.  $d1$  ist ein zusätzlicher Relaxations-Delay. Die Intensität der selektiven Gauß-Pulse liegt bei  $\gamma B_1 = 86 \text{ Hz}$ .

**Kasten 2: Parameter, die STD-Effekte beeinflussen**

Das Schema zeigt die Situation in einer Ligand und Rezeptor enthaltenden Lösung nach einer Anfangssättigungszeit von typischerweise 50 bis 200 ms. Nimmt man einen großen Überschuss des Liganden gegenüber dem Protein an, kann man die wiederholte Bindung ("Re-binding") bereits gesättigter Ligandenmoleküle vernachlässigen (Verwendete Abkürzungen: r.f. Radiofrequenz für die Sättigung,  $\tau_{\text{sat}}$  Sättigungszeit,  $\tau_{\text{res}}$  Verweilzeit des Liganden in der Bindungstasche,  $P^*$  gesättigtes Protein, L ungesättigter Ligand,  $L^*$  gesättigter Ligand).



Während der Sättigungszeit  $\tau_{\text{sat}}$  wird die Bindungstasche des Proteins nacheinander von  $n$  Ligandenmolekülen mit  $n = f_{\text{PB}} \cdot \tau_{\text{sat}} / \tau_{\text{res}}$  besetzt ( $f_{\text{PB}}$  ist der Bruchteil der besetzten Bindungsstellen, siehe Kasten 1). Dies bewirkt eine Verstärkung der Informationen, die aus dem gesättigten Protein resultieren. Ein großer Überschuss an Liganden garantiert dabei maximale Effekte.

Eine kürzlich erschienene Arbeit behandelt die Theorie der vollen Relaxationsmatrix zur Berechnung theoretischer STD-Effekte, wobei Bindungskinetik und -thermodynamik sowie sämtliche Protonen der Bindungstasche berücksichtigt werden.<sup>[128]</sup>

Proteins und anderer Moleküle wie Verunreinigungen und nichtbindenden Komponenten zu beobachten.

Daher wird in einem zweiten Experiment die Einstrahlfrequenz weit entfernt von jeglichem Signal, z. B. bei 40 ppm, gewählt („Off-Resonance“-Experiment). Das so aufgenommene Spektrum entspricht einem normalen NMR-Spektrum des Gemisches. Die Subtraktion des On-Resonance- vom Off-Resonance-Spektrum ergibt ein Differenzspektrum, das nur noch Signale der Protonen enthält, die durch den Sättigungstransfer abgeschwächt worden sind. Moleküle ohne Bindungsaktivität liefern in diesem Spektrum keinerlei Signale.

Die Sättigung von Kernen des Proteins und der gebundenen Liganden wird sehr schnell erreicht, typischerweise in 100 ms. Eine hohe Dissoziationsgeschwindigkeit transferiert die Sättigung der Ligandenkerne mit dem Liganden in die Lösung. Liegt dieser im großen Überschuss vor, kann über eine Bindungsstelle am Protein während der Sättigungszeit von wenigen Sekunden eine Vielzahl von Ligandenmolekülen gesättigt werden. Da die Zeitkonstante der  $T_1/T_2$ -Relaxation ca. 1 s für kleine Moleküle beträgt, nimmt der Anteil gesättigter Liganden in Lösung während der Sättigungszeit zu. Durch diesen Sättigungstransfer vom Protein auf den Liganden (Verstärkung der Information über den gebundenen Zustand) wird die benötigte Menge an Protein herabgesetzt. Das STD-Prinzip ist in Schema 1 veranschaulicht. Ist dagegen die Bindung des Liganden an den Rezeptor sehr stark und daher die Dissoziationsgeschwindigkeit sehr klein ( $k_{\text{diss}}$  liegt dann in der Größenordnung von 0.1 bis 0.01 Hz), verläuft der Sättigungstransfer auf den Liganden in Lösung

nicht sehr effizient. Dies wird für  $K_D$ -Werte  $< 1 \text{ nm}$  erwartet. Bei  $K_D$ -Werten in der Größenordnung von 100 nm oder größer erfolgt ein schneller Austausch zwischen freien und gebundenen Liganden, was zu einem sehr effizienten Aufbau der Sättigung von Liganden in Lösung führt.

Es ist offensichtlich, dass die gefundenen Intensitäten der Ligandensignale im STD-NMR-Spektrum nicht proportional zur Bindungsstärke sind. STD-NMR-Effekte hängen stark von der Dissoziationsgeschwindigkeit (charakterisiert durch  $k_{\text{diss}}$ ) ab. Wie oben erläutert, sollten größere  $k_{\text{diss}}$ -Werte zu stärkeren STD-Signalen führen. Ist jedoch die Bindung sehr schwach, wird auch die Verweildauer eines Liganden in der Rezeptor-Bindungstasche sehr kurz, was wiederum zu schwachen STD-Intensitäten führt. STD-NMR-Spektroskopie kann daher bei sehr starker Bindung bis hin zu  $K_D$ -Werten von ungefähr 10 mM angewendet werden.

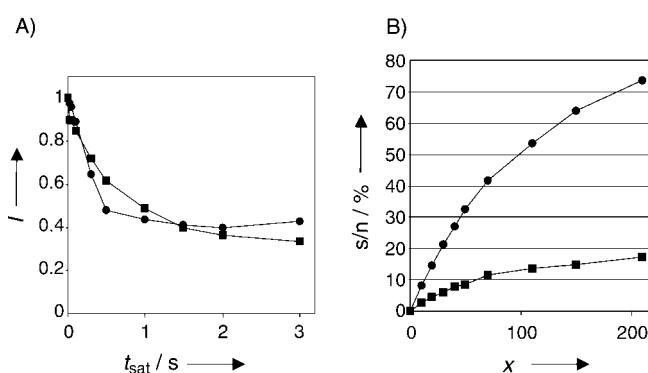
Wie aus dem Pulsdiagramm in Abbildung 2 ersichtlich, ist die Anwendung eines Spinlock-Filters nach dem Beobachtungspuls von Vorteil, um damit den Hintergrund der Proteinsignale zu unterdrücken. Werte zwischen 10 und 20 ms für die Dauer des Spinlockpulses werden für diese Signalunterdrückung als ausreichend angesehen. Bei Verwendung isotopenmarkierter Liganden gelingt dieser Effekt natürlich auch durch Isotopenfilter-Experimente. Die Intensität der STD-NMR-Signale hängt unter anderem von der Einstrahlungszeit/Sättigungszeit und vom Überschuss der Ligandenmoleküle ab (Abbildung 3) Je mehr Ligand vorliegt und je länger die Einstrahlungszeit, desto intensiver wird das STD-NMR-Signal. In Abbildung 3 wird deutlich, dass sich die Kurven asymptotisch einem Grenzwert annähern. Eine Einstrahlungszeit von 2 s und ein etwa 100facher Ligandenüberschuss liefern gute Resultate. Der Ligandenüberschuss resultiert in

**Kasten 3: Techniken zur selektiven Anregung**

Radiofrequenzpulse mit einem selektiven Anregungsprofil sind sehr wichtige Hilfsmittel in der NMR-Spektroskopie. Die Selektivität der Pulse wird generell durch eine Reduzierung der  $B_1$ -Intensität mit einer gleichzeitigen Verlängerung der Pulsdauer erreicht. Rechteckpulse werden für selektive Anregungen wegen ihres unvorteilhaften Anregungsprofils in Form einer sinc-Funktion selten herangezogen. Die damit verbundenen Seitenbänder führen zu unerwünschten Signalanregungen, weswegen eine Reihe verschiedener Pulsformen erarbeitet wurden. Eine der effektivsten Pulsformen zur selektiven Anregung ist die Gauß-Form [Gl. (9)].

$$S(t) = \exp[-a(t-t_0)^2] \quad (9)$$

Hierbei ist  $t_0$  das Zentrum des Pulses,  $S$  die Intensität des Pulses,  $t$  die Zeit und  $a$  enthält Informationen über die Pulsdauer und damit die Linienbreite. Die Fourier-Transformierte der Gauß-Funktion ist ebenfalls eine Gauß-Funktion, sodass das Seitenbandenproblem größtenteils reduziert ist. Die Familie der BURP-Pulse ist speziell für NMR-Experimente entwickelt worden, bei denen reine Phasenspektren erwartet werden und bei denen die uniforme Anregung einer Region von Signalen erforderlich ist.<sup>[127]</sup> Für die in diesem Aufsatz beschriebenen Sättigungstransfer-Experimente ist die Verwendung von Gauß-Pulsen üblicherweise ausreichend. Anstelle eines langen Gauß-Pulses (Sättigungszeiten liegen im Bereich zwischen 1 und 2 s) wird eine Kaskade von Gauß-Pulsen angewendet (je 50 ms im Abstand von 1 ms). Dies garantiert eine Bandbreite der Anregung in der Größenordnung von 40 Hz.



**Abbildung 3.** A) Normalisierte Integralwerte (I) ausgewählter 1D-NMR-Signale (●: O-Methylgruppen des FucOMe, ■: H6-Methylgruppen von FucOMe) als Funktion der Sättigungszeit ( $t_{\text{sat}}$ ). Der Ligand O-Methyl- $\alpha$ -L-fucose (FucOMe) wurde in einem 30fachen molaren Überschuss relativ zum Protein AAA eingesetzt. Es ist offensichtlich, dass die Abnahme der Intensität ungefähr bei 60% der Originalintensität abflacht. B) Signal-Rausch-Verhältnis (s/n) von STD-NMR-Spektren bei 500 MHz als Funktion des molaren Ligandenüberschusses (x) (GlcNAc, ●: N-Acetyl-Gruppe, ■: H1) relativ zum Protein (WGA).

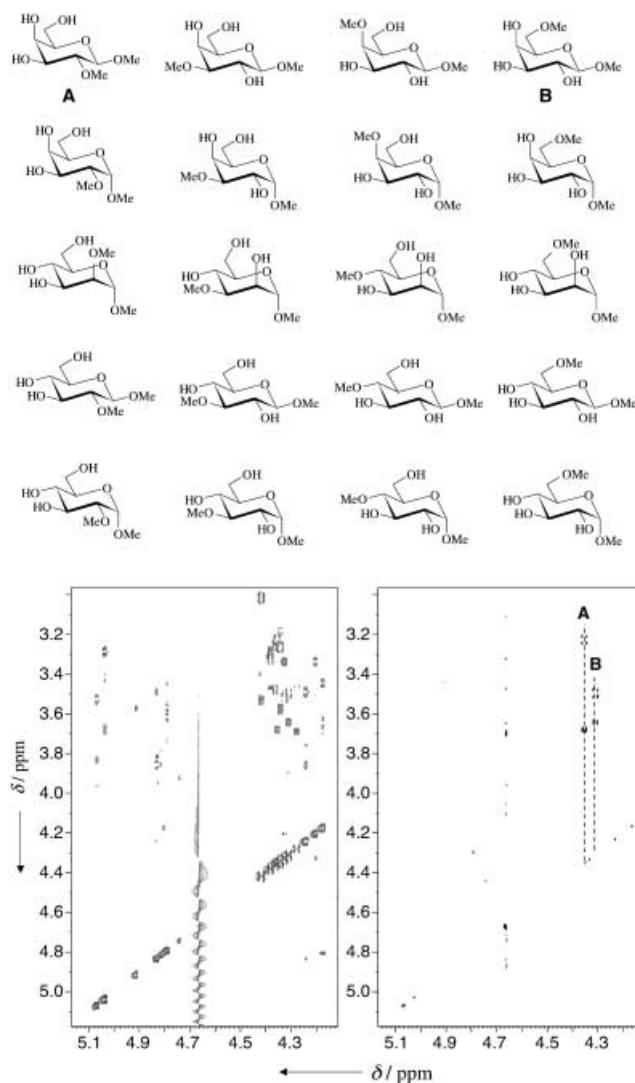
einem stärkeren STD-Signal, obwohl ein kleinerer Anteil der Liganden gesättigt wird. Nach der Dissoziation wird die Sättigung des Liganden in die Lösung transportiert, wo sie durch Relaxationsprozesse nur langsam abgebaut wird. Bevor die Liganden in der Lösung ihre Sättigung verloren haben, kann der Prozess der Assoziation und Dissoziation mit anderen Liganden mehrfach stattfinden, was in einer Akkumulation vieler gesättigter Liganden in Lösung resultiert. Der Nettoeffekt der Sättigung von Ligandenprotonen ist maximal, wenn ein großer Ligandenüberschuss verwendet wird, da dann eine erneute Belegung der Bindungstasche mit einem bereits gesättigten Liganden sehr unwahrscheinlich ist. Der hohe Ligandenüberschuss macht eine der Hauptstärken dieses Verfahrens deutlich: Die für die Messung benötigte Proteinmenge ist sehr klein. Bei 500 MHz sind weniger als 0.3 nm Protein ausreichend, um STD-NMR-Spektren zu erhalten. Bei einem Molekulargewicht von 50 kDa entspricht das 15  $\mu$ g Protein.

Aus einer kleinen Bibliothek von Kohlenhydratliganden wurde mithilfe eindimensionaler STD-NMR-Spektroskopie die Verbindung *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) als die einzige mit Bindungsaffinität für das Protein WGA identifiziert. Alle anderen Moleküle zeigten keine Antwort in den STD-Spektren. Wie bereits erwähnt, kann das STD-Prinzip mit beliebigen anderen NMR-Pulssequenzen kombiniert werden, was z. B. zum STD-TOCSY-Experiment führt. Besonders für komplexe Bibliotheken ist die zusätzliche Dekonvolution von Signalen durch die zweite Dimension sehr hilfreich. Das STD-TOCSY-Experiment kann sehr gut bei der Aufklärung des Bindungseptops von Liganden eingesetzt werden.<sup>[54,57-59]</sup>

Durch diese Methode gelang es, aus einer Bibliothek ähnlicher Kohlenhydratderivate die bindenden Komponenten zu identifizieren. Hierzu wurde eine Fraktion von 20 dimethylierten Monosacchariden, die durch zufällige Methylierung von D-Galactose, D-Glucose und D-Mannose erhalten wurden, auf ihre Bindungsaffinität zum Lectin der Holunder-

beere (*Sambucus-nigra*-Agglutinin, SNA) getestet.<sup>[56]</sup> Aus Abbildung 4 geht hervor, dass nur Verbindungen mit  $\beta$ -D-Galacto-Konfiguration und unmethylierten OH-Gruppen in 3- und 4-Position binden. Mit einer konventionellen Screeningtechnologie wäre die direkte Identifizierung der Verbindungen mit Bindungsaktivität aus der Mischung sehr schwer bis unmöglich gewesen, da hierfür eine saubere Trennung aller unterschiedlichen Verbindungen nötig gewesen wäre. Es wäre daher notwendig gewesen, alle 20 Komponenten der Bibliothek einzeln zu resynthetisieren und mit einem Schritt-für-Schritt-Screening-Prozess zu untersuchen.

Weiterhin gelang mit geringem Aufwand die Herstellung einer zufällig <sup>13</sup>C-methylierten Bibliothek von O-Methyl-Galactosiden. Wegen der Isotopenmarkierung können durch HSQC- und HMBC-Experimente mit STD-Filter auf ein-



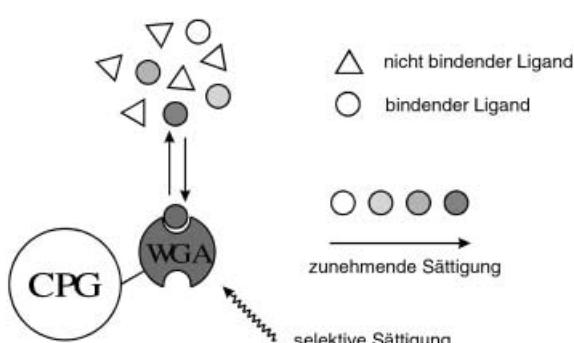
**Abbildung 4.** Links: 500 MHz TOCSY-Spektrum der oben gezeigten Verbindungsmischung, gezeigt ist nur der Anteil, der von Protonen am anomeren Zentrum der Monosaccharidderivate herrührt. Rechts: STD-TOCSY-Spektrum der Mischung in Gegenwart des Lectins SNA (ca. 50facher molarer Ligandenüberschuss). Das Spektrum zeigt deutlich, dass nur die zwei  $\beta$ -D-Galactosederivate A und B an das Protein binden.

fache Weise die Hydroxygruppen des Zuckers identifiziert werden, die für die Bindung an das Protein essentiell sind. Wollte man diese Informationen durch Standard-Bindungsassays erhalten, so müsste man jede Verbindung einzeln synthetisieren. Die STD-NMR-Variante erlaubt so selbst für sehr komplexe Mischungen methylierter Liganden eine schnelle Identifizierung von Hydroxy- und Carboxyfunktionen, die für die Bindung an ein Protein erforderlich sind.

### 2.1.1. Charakterisierung der Ligandenbindung an immobilisierte Proteine durch STD-NMR-Spektroskopie

Viele interessante Targets bei der Entwicklung von Medikamenten sind membrangebundene Proteine. Werden diese Proteine aus ihrer natürlichen Membranumgebung entfernt, verlieren sie häufig ihre Struktur und Funktionalität. Der einzige Weg, dieses Problem zufriedenstellend zu lösen, ist die Untersuchung der Proteine in einer biologischen Membran. Andererseits lassen sich für membranständige Proteine keine hochauflösten NMR-Spektren erhalten. Daher sind strukturelle Untersuchungen an membrangebundenen Proteinen bisher ausschließlich mithilfe der Magic-Angle-Spinning(MAS)-NMR-Spektroskopie durchgeführt worden. Die STD-NMR-Spektroskopie hat hier den signifikanten Vorteil, dass die Bindung von Liganden an membrangebundene Proteine auch in der natürlichen Membranumgebung problemlos untersucht werden kann.

In einem Pilotexperiment wurde WGA auf Glaspartikeln mit Hohlräumen definierter Größe (Controlled Pore Glass Particles, CPG) immobilisiert und die Bindung von Kohlenhydratderivaten an dieses immobilisierte WGA mithilfe von STD-NMR-Spektroskopie in einem Hochauflösungs-MAS-(HR-MAS)-Experiment untersucht.<sup>[60]</sup> Die resultierenden STD-NMR-Spektren liefern nur Signale von den Ligandenmolekülen mit Bindungsaffinität. Die Immobilisierung von Proteinen auf Festkörperpartikeln kann auch genutzt werden, um Proteine schneller durch Filtration aus einer Mischung von Liganden und Protein zurückzugewinnen. Durch diese Technik sollte die Realisierung eines Hochdurchsatz-Screeningverfahrens mit wertvollen Proteinen leichter möglich sein (Schema 2).

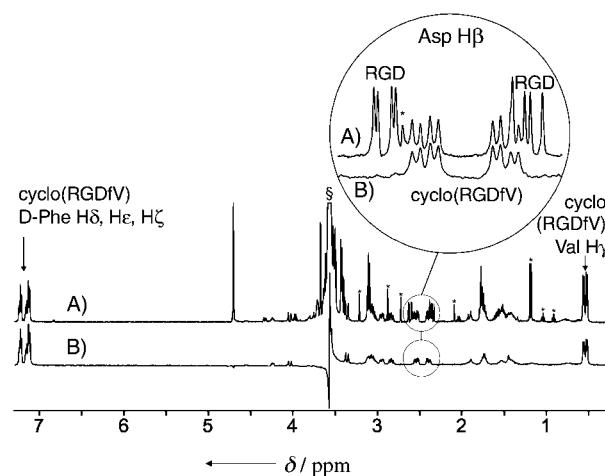


**Schema 2.** Identifizierung der Ligandenbindung an immobilisiertes Protein durch die HR-MAS-Technik.

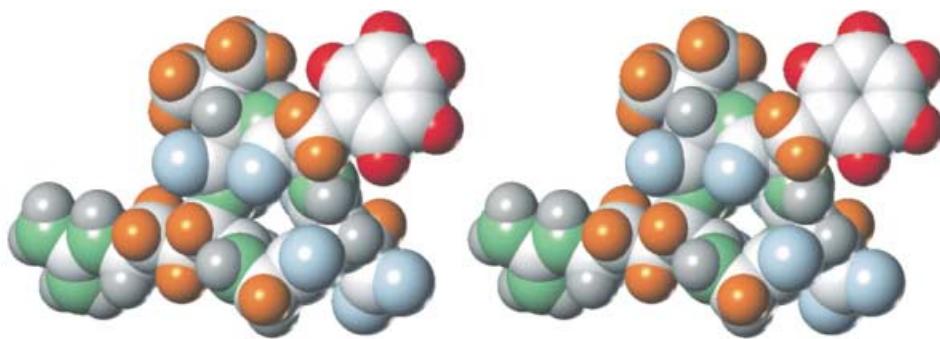
### 2.1.2. Charakterisierung der Bindung von Liganden an membrangebundene Proteine durch STD-NMR-Spektroskopie

Zur Analyse membrangebundener Proteine in ihrer natürlichen Umgebung haben wir Integreine in Liposomen eingebettet und deren Bindungseigenschaften mit STD-NMR-Spektroskopie untersucht.<sup>[61]</sup> Viele membrangebundene Proteine können in Lösung durch Detergenzien stabilisiert werden. Solubilisiertes Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde in Liposomenmembranen integriert, die aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und Dimyristoylphosphatidylglycerin (DMPG) bestanden. Diese Liposomen haben einen Durchmesser von ungefähr 200 nm und tragen je etwa 50 % der Integreine nach innen und nach außen gerichtet. Es ist bekannt, dass Integreine an Peptide binden, die das RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp) enthalten. Die Bindung solcher Peptide an die liposomenintegrierten Integreine wurde in homogener Lösung durch STD-NMR-Spektroskopie untersucht. Es konnte eine klare Unterscheidung zwischen Peptiden mit und ohne Bindungsaffinität zu Integrenen getroffen werden. Ebenso konnten stärkere Liganden eindeutig von schwächeren unterschieden werden, da die stärkeren die schwächeren vollständig aus der Bindungstasche verdrängen.

Wir konnten zeigen, dass ungefähr 0.25 nm Integrin für eine Untersuchung seiner Bindungsspezifität ausreicht. Das cyclische Peptid Cyclo(RGDFV), das in der Arbeitsgruppe von Kessler<sup>[62]</sup> als spezifischer Inhibitor für das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  entwickelt worden war, hat ebenfalls eine hohe Bindungsspezifität für das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , was sich in einer Dissoziationskonstante von etwa 5  $\mu\text{M}$  widerspiegelt. Dieses Cyclopeptid verdrängt das offenkettige Peptid RGD vollständig aus der Bindungstasche (Abbildung 5). Die Bindung des Peptids an das liposomenintegrierte Integrin ist bis zu einer Konzentration von ungefähr 20  $\mu\text{M}$  spezifisch. Bei höheren



**Abbildung 5.** NMR-Spektren einer Lösung von 274  $\mu\text{M}$  RGD und 264  $\mu\text{M}$  Cyclo(RGDFV) mit Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ , das in Liposomen integriert ist. A) Im normalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum werden die Signale beider Liganden beobachtet. Der Einschub zeigt die gedehnte Region der beiden diastereotopen  $\beta$ -Protonen des Aspartatrestes (als Nebenkomponenten sind der Puffer [Tris] und eine Verunreinigung durch \* markiert zu sehen). B) Im STD-NMR-Spektrum werden nur STD-Effekte mit dem stark bindenden Cyclopeptidliganden beobachtet. Die untere Spur im Einschub zeigt nur Signale von Cyclo(RGDFV).



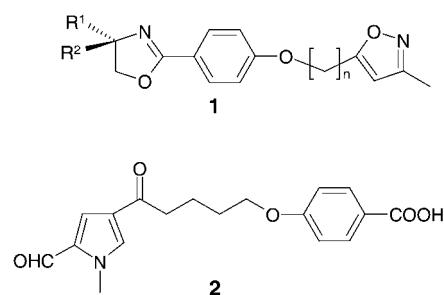
**Abbildung 6.** Stereodarstellung des Bindungsepitops von Cyclo(RGDfV). Das Schema zeigt eine Kombination der 3D-Struktur von Cyclo(RGDfV) in DMSO, wie sie von Aumailley et al.<sup>[122]</sup> auf der Grundlage von NMR-spektroskopischen Daten und MD-Simulationen erarbeitet wurde. Die aus den STD-NMR-Experimenten abgeleiteten funktionellen Gruppen, die das Bindungsepitop des cyclischen Liganden bilden, sind in rot und orange hervorgehoben. Die Protonen am aromatischen Ring des D-Phe zeigen starke STD-Effekte (rot), die eine große Nähe zum Integrin belegen. Die mittleren STD-Intensitäten (orange) von Val-H $\gamma$ , Arg-H $\alpha$ , Arg-H $\beta$  und Arg-H $\gamma$  zeigen ebenfalls direkte Bindung zum Protein an. Andere Moleküle mit mittleren STD-Intensitäten sind D-Phe-H $\beta$ , ein Asp-H $\beta$  und ein Gly-H $\alpha$  (orange).

Konzentrationen tritt zusätzlich unspezifische Bindung auf, die aber potenziell auch auf eine Bindung in einer sehr niedrig affinen Bindungstasche zurückzuführen ist. Abschließend wurde durch Kontrollexperimente klar gezeigt, dass keine unspezifische Bindung der Peptidliganden an die Protein-freien Liposomen stattfindet.

Auch das Bindungsepitop des cyclischen Peptids Cyclo(RGDfV) konnte durch STD-NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Die Bindung erfolgt hauptsächlich über den Phenylring des Phenylalanins, während der Aspartatrest ebenso wie der Argininrest etwas schwächer mit dem Protein wechselwirkt. Im Falle des Aspartatrests wird der Kontakt durch die Carboxygruppe hergestellt, wohingegen beim Argininrest eine hydrophobe Wechselwirkung vorhanden ist. Der Valinrest partizipiert ebenfalls an der Bindung (Abbildung 6). Die Integrin-Ligand-Wechselwirkung ist für gelöste Integrine ungefähr 100-mal schwächer als für solche in membranintegrierter Form. Daher ist es wichtig, die Wechselwirkungen membrangebundener Proteine mit ihren Liganden in einer dem natürlichen System möglichst ähnlichen Umgebung zu untersuchen.

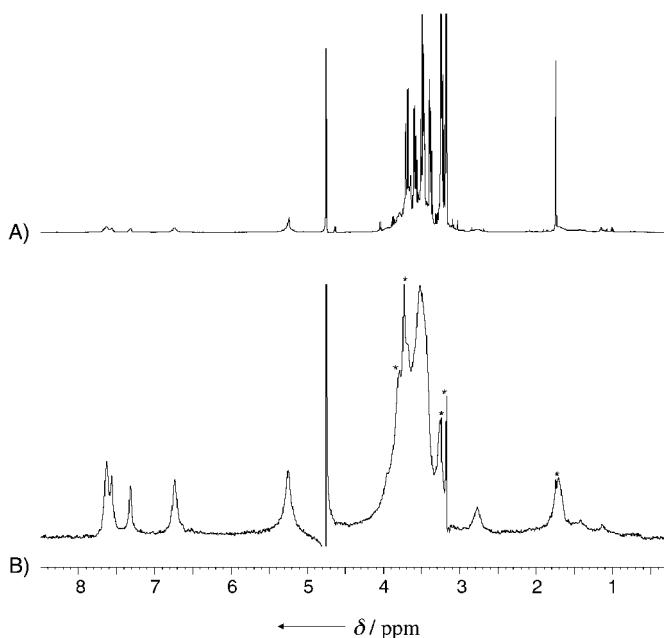
### 2.1.3. STD-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Ligandenbindung an intakte Viren

Zurzeit werden neue Verbindungen, so genannte Entry-Inhibitoren, erforscht, die Virus-Infektionen dadurch verhindern, dass sie das Virus am Eindringen in die Wirtszelle hindern. Entry-Inhibitoren, die spezifisch das Virus blockieren und nicht mit der Wirtszelle wechselwirken, könnten Ansatzpunkte für neue Therapien liefern, die frei von Nebenwirkungen sind. Um solche Leitsubstanzen für die Entwicklung von Entry-Inhibitoren zu finden, werden Informationen über die Zusammensetzung und die Form der viralen Hülle benötigt. Für einige humane Rhinoviren (HRV), die beim Menschen Erkältungen verursachen, wurden durch Röntgenkristallographie komplett Strukturanalysen der viralen Hülle durchgeführt.<sup>[63–68]</sup> Auf der Basis dieser Resultate wurde eine Klasse von Inhibitoren, die WIN-Verbindungen (**1**) (Winthrop Sterling), synthetisiert. Verbin-



dungen dieses Typs binden in dem so genannten Canyon auf der Virusoberfläche und behindern damit das Virus bei der Infektion der Wirtszelle. Eine dieser Verbindungen, Pleconaril, ist momentan in Phase 3 der klinischen Testung.<sup>[69,70]</sup>

Es ist bereits gezeigt worden, dass die Durchführung NMR-spektroskopischer Experimente mit nativen Viren möglich ist. Durch Linienverbreiterungseffekte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sind Dissoziationskonstanten von Neuraminsäure, die an Influenza-Viren bindet, bestimmt worden.<sup>[71]</sup> In einer kürzlich durchgeföhrten Studie haben wir die Prinzipien von STD-NMR-Spektroskopie an nativen Viren erfolgreich anwenden können, was völlig neue Perspektiven für ein direktes Screening von Entry-Inhibitoren eröffnet, die gegen humane Rhinoviren gerichtet sind. Wir haben STD-NMR-Spektren des synthetischen Entry-Inhibitors Repla 394 (**2**) erhalten, die die Bindung an das völlig funktionale Virus charakterisieren<sup>[71b]</sup>. Dass die Bindung spezifisch ist, wird dadurch demonstriert, dass nicht bindende Moleküle keine STD-Signale zeigten (Abbildung 7). In einem Konkurrenz-STD-NMR-Experiment wurde dann ein bekannter Entry-Inhibitor zu einer Lösung von HRV-2 und Repla 394 hinzugegeben, was zu einer Abnahme der STD-NMR-Intensitäten von Repla 394 führte. Dieses Konkurrenzexperiment belegt die Annahme, dass es möglich ist, die Bindung von Liganden an den Canyon des HRV mit STD-NMR-Spektroskopie zu beobachten. Dieses Verfahren ermöglicht die direkte Charakterisierung potenzieller Entry-Inhibitoren von Rhinoviren – und sehr wahrscheinlich vieler anderer Viren.



**Abbildung 7.**  $^1\text{H}$ -NMR-Referenzspektrum (A) und STD-NMR-Spektrum (B) des nativen HRV-2 ( $0.04 \mu\text{M}$ ) in Gegenwart von Repla 394 (2, 0.05 mM), Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (4.8 mM) und Methanol (6.2 mM). Die Spektren wurden auf einem 500 MHz-Gerät bei 298 K aufgenommen, wobei 4000 Scans für das Differenzspektrum und 2000 Scans für das Referenzspektrum benötigt wurden. Die Signale des Differenzspektrums sind ausschließlich Repla 394 zuzuordnen, einem Entry-Inhibitor von HRV-2, und belegen eindeutig die Bindung dieses Liganden an das Virus. Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Methanol liefern keine STD-Signale und auch keine Artefakte, obwohl sie in großem Überschuss vorhanden sind. Dies ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, dass beide Verbindungen nicht an das HRV-2 binden.

#### 2.1.4. Bestimmung des Bindungsepitops mit STD-NMR-Spektroskopie

STD-NMR-Spektroskopie ist ideal geeignet zur Identifizierung der Bausteine von Liganden, die in direktem Kontakt zu einem Rezeptor stehen, da diese Bausteine einen höheren Grad an Sättigung erfahren als solche, die nicht direkt mit dem Protein wechselwirken. Beispielsweise zeigen STD-NMR-Experimente mit einem Hexasaccharid, das an das Lectin *Aleuria-aurantia*-Agglutinin (AAA) bindet, zweifelsfrei, dass nur die Fucosylreste mit dem Protein wechselwirken (Abbildung 8).<sup>[54]</sup>

In einer anderen Studie wurde kürzlich das Bindungsepitop des Sialyl-Lewis $^X$ -Tetrasaccharids, gebunden an das L-Fucose erkennende AAA, mithilfe von STD-TOCSY-Experimenten bestimmt.<sup>[57]</sup> Ein normales TOCSY-Spektrum von Sialyl-Lewis $^X$  und ein STD-TOCSY-Spektrum von Sialyl-Lewis $^X$  in Gegenwart von AAA sind in Abbildung 9 gezeigt. Das STD-TOCSY-Spektrum weist nur Signale des L-Fucose-rests des Sialyl-Lewis $^X$  auf, was belegt, dass dieser das Hauptbindungsepitop des Tetrasaccharids ist.

Die Bestimmung des Bindungsepitops (Epitop-Kartierung) durch STD-NMR-Spektroskopie wurde auch für ein bakterielles Lipopolysaccharidfragment, das von einem monoklonalen Antikörper spezifisch gebunden wird, erfolgreich

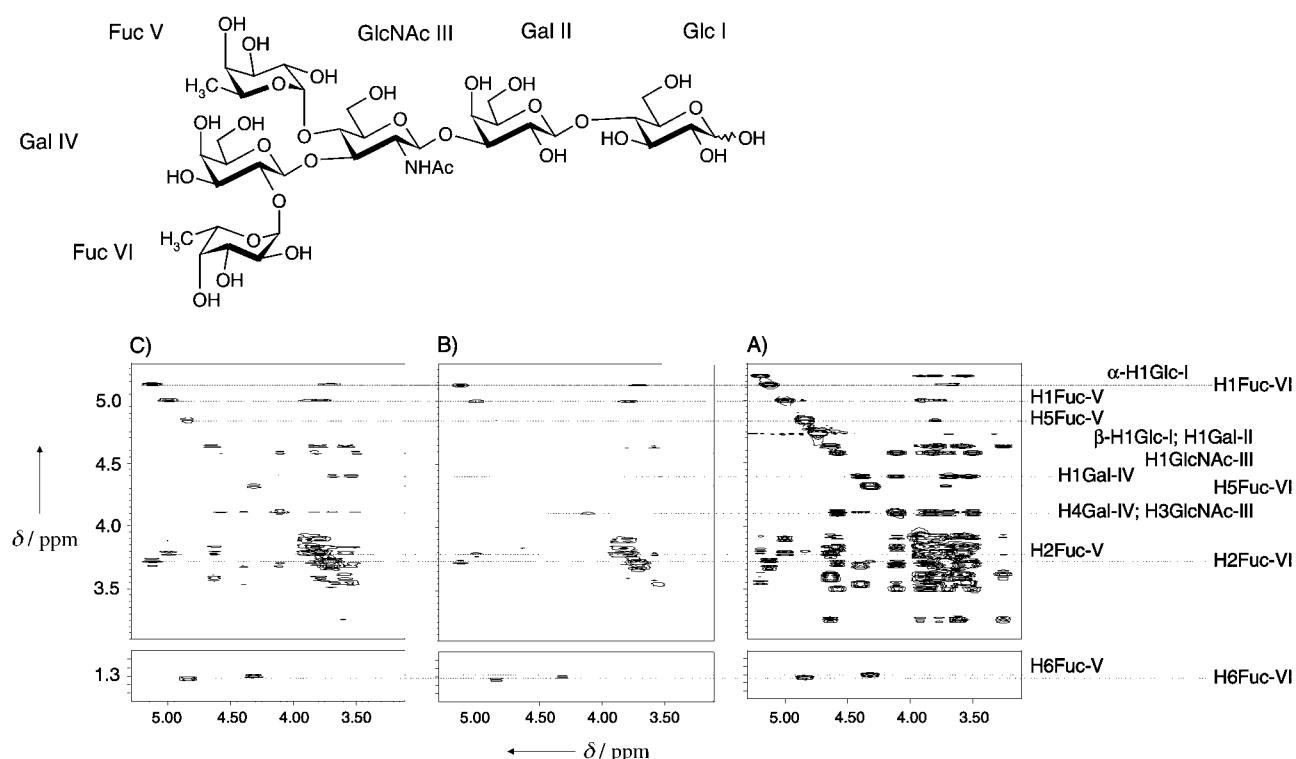
durchgeführt. Obwohl das Lipopolysaccharidfragment ein Molekulargewicht im Bereich von mehreren kDa hatte, war es möglich, die funktionellen Schlüsselgruppen, die durch verschiedene monoklonale Antikörper erkannt werden, zu bestimmen. Diese Experimente halfen entscheidend, die differenzierende Erkennung des Kohlenhydratepitops durch die Antikörper auf atomarer Ebene zu verstehen.<sup>[72]</sup>

#### 2.1.5. Epitop-Kartierung einzelner funktioneller Gruppen mit STD-NMR-Spektroskopie

Durch die so genannte Gruppen-Epitop-Kartierung (Group Epitope Mapping, GEM) kann das Bindungsepitop noch wesentlich detaillierter bestimmt werden.<sup>[58]</sup> Für GEM ist es wichtig, dass die Verweildauer des Liganden in der Bindungstasche deutlich kürzer ist als  $T_2$  des Liganden im gebundenen Zustand. Wir konnten zeigen, dass die bindenden funktionellen Gruppen direkt aus den STD-NMR-Spektren abgelesen werden können.<sup>[58]</sup> Daher ist die Bestimmung von an der Bindung beteiligten funktionellen Gruppen nicht nur auf Einheiten beschränkt, die über Spin-Spin-Kopplung von anderen Resten des Moleküls abgetrennt sind. Wie schon erwähnt, ist GEM möglich, falls der Ligand eine relativ große Dissoziationsgeschwindigkeit hat ( $k_{\text{diss}}$ ), was für Dissoziationskonstanten  $K_D$  von ungefähr  $0.1 \mu\text{M}$  oder größer der Fall ist. Stärkere Bindung führt zu einer zu langen Verweildauer des Liganden am Rezeptor. Während dieser Zeit verschwinden durch Spindiffusion innerhalb eines Ligandenbausteins die Unterschiede zwischen direkt mit der Bindungstasche wechselwirkenden Protonen und solchen, die nicht in direktem Kontakt mit der Bindungsstelle sind. Eine Unterscheidung der betreffenden Protonen ist für solche Liganden nur schwer möglich. GEM ist bei so unterschiedlichen Liganden wie Peptiden, Kohlenhydraten oder aromatischen Verbindungen experimentell durchgeführt worden. Als anfängliches Beispiel diente die Kohlenhydraterkennung durch Lectine.

Die funktionellen Gruppen des Liganden Methyl- $\beta$ -D-galactosid ( $\beta$ -D-GalOMe), die direkt an das 120 kDa große Protein *Ricinus-Communis*-Agglutinin ( $\text{RCA}_{120}$ ) binden, konnten durch einfache STD-NMR-Experimente bestimmt werden. Nur H2, H3, H4 und H6 der Galactose sind an der Bindung zum Protein beteiligt (Abbildung 10). Dies stimmt hervorragend mit früher publizierten Resultaten überein, die mithilfe chemischer Modifikationen entsprechender funktioneller Gruppen erhalten worden waren.<sup>[130]</sup>

Das 1D-STD-Spektrum des biantennären Decasaccharids, das in einem elffachen Überschuss in Gegenwart von  $\text{RCA}_{120}$  untersucht wurde, zeigt eindeutig, dass die terminalen Galactose- und GlcNAc-Reste direkt in die Bindung mit dem Protein involviert sind. Die Intensitäten der Kohlenhydratreste nah am reduzierenden Ende sind sehr klein (Abbildung 11). Die terminalen  $\beta$ -D-Galactoseeinheiten sind über H2, H3, H4 und H6 stark an der Bindung beteiligt. Auch H2, H3 und H4 des vorletzten  $\beta$ -D-Glucosaminrestes, die sich ebenfalls nahe an der Proteinoberfläche befinden, tragen zur Bindung bei. Wegen Signalüberlappungen konnte der individuelle Anteil von H2, H3 und H4 des GlcNAc-Restes nicht



**Abbildung 8.** Bestimmung des Bindungsepitops von Lacto-*N*-difucosylhexaose I, gebunden an das Protein AAA. A) Spektrum des Liganden allein (kein Protein); B) STD-TOCSY-Spektrum in Gegenwart des Proteins, wobei nur intensive Signale der beiden Fucosylreste V und VI beobachtet werden; C) STD-TOCSY-Spektrum, das bei etwa 60% der in B) gezeigten Konturebenen geschnitten wurde. Man sieht neben den Signalen der Fucosylreste auch Kreuzsignale, die von den Resten Galactose IV und GlcNAc III herrühren. Schneidet man noch tiefer, so beobachtet man auch Signale noch geringerer Intensität, die von den Resten Galactose II und Glucose I herrühren (bei ungefähr 30% der Intensität der Kreuzsignale von B) [nicht gezeigt]). Das STD-TOCSY-Spektrum wurde bei 300 K mit einer On-Resonance-Einstrahlung bei 10 ppm, einer Off-Resonance-Einstrahlung bei 30 ppm und einer Sättigungsleistung von 0.2 W aufgenommen.

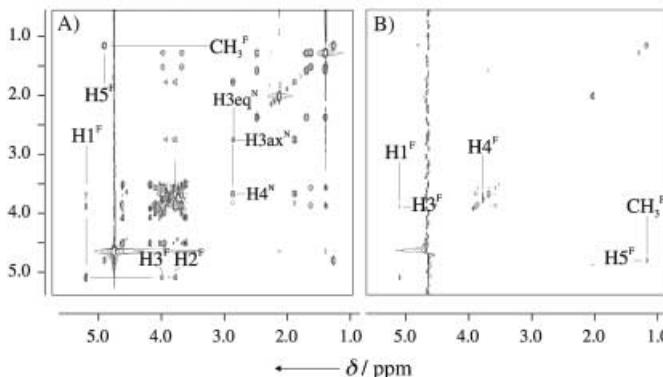
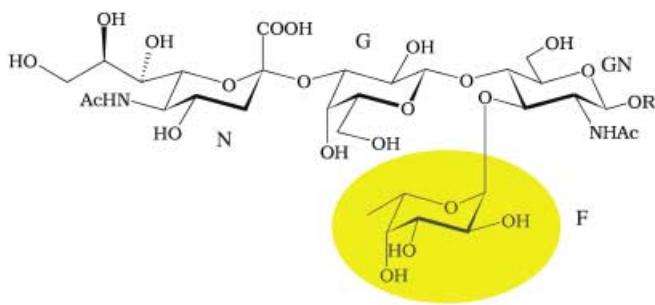
eindeutig bestimmt werden. Die anderen Protonen des GlcNAc-Restes haben keinen Kontakt zur Proteinoberfläche. Dies zeigt, dass die GlcNAc-Reste zu einem Teil die Bindungsspezifität größerer Kohlenhydratliganden vom komplexen Typ mitbestimmen.

Dasselbe Ergebnis konnte aus Untersuchungen mit *N*-Acetylglucosamin als Ligand abgeleitet werden. Es war bereits früher gezeigt worden, dass die Verlängerung von Galactoseeinheiten am reduzierenden Ende durch einen GlcNAc-Rest die Bindungsaffinität gegenüber RCA<sub>120</sub> um etwa 20 % verbessert.<sup>[131]</sup>

In einem weiteren Beispiel wurde die Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal an  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase aus Säugetieren ( $\beta$ 4Gal-T1, EC 2.4.1.90/38) untersucht. Dieses Enzym findet sich im Golgi-Apparat als membrangebundenes Protein und ist für den Transfer von Galactose, in Form von UDP-Galactose (UDP-Gal), auf  $\beta$ -D-*N*-Acetylglucosamineeinheiten verantwortlich. Dabei werden Poly-*N*-acetyl-lactosaminketten erhalten, wie sie in Glycoproteinen und Glycosphingolipiden gefunden werden. STD-NMR-Experimente wurden genutzt, um die molekularen Details der Erkennung zwischen der Galactosyltransferase und UDP-Gal zu charakterisieren.<sup>[73]</sup> GEM zeigte eindeutig, dass die Protonen des UDP-Teils in engem Kontakt mit dem Enzym sind,

während die des Galactosylrestes nur einen relativ geringen Sättigungstransfer erfahren (Schema 3).

Interessanterweise erhielten H2 und H4 des Galactosylrestes den größten Anteil an Sättigungstransfer. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Studien, denen zufolge die entsprechenden Hydroxygruppen essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms sind.<sup>[73,74]</sup> Eine kürzlich beschriebene Röntgenstrukturanalyse von Lactosynthase ( $\beta$ 4Gal-T1 im Komplex mit  $\alpha$ -Lactalbumin) zeigte, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen OH4 und dem <sup>31</sup>Aspartatrest des Enzyms besteht.<sup>[75]</sup> In dieser Orientierung zeigt H4 in das Innere des Proteins, was die relativ stärkere Sättigung von H4 des Galactosylrestes erklärt. In einem weiteren Experiment wurde die Bindung von UDP-Glucose (UDP-Glc) an  $\beta$ 4-Gal-T1 untersucht. UDP-Glc ist ein kompetitiver Inhibitor der Galactosyltransferase, ist aber ein sehr schwaches Donorsubstrat mit weniger als 1 % der Aktivität relativ zu UDP-Gal. Die STD-NMR-Spektren zeigen, dass der UDP-Teil der UDP-Glc an das Enzym bindet, während der Glucosylrest keine Sättigung erhält. Offensichtlich behält der Glucosylrest der UDP-Glc signifikante konformativere Freiheit bei der Bindung an das Enzym, sodass der Transfer von Glucoseeinheiten zu einem Acceptor weniger effizient ist.



**Abbildung 9.** A) 500 MHz-TOCSY-Spektrum von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (siehe die Struktur oben im Spektrum). Die gesamten Spinsysteme aller Pyranoseringe sind deutlich zu erkennen. B) STD-TOCSY-Spektrum von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in Gegenwart von AAA (molares Verhältnis von Ligand zu Protein ca. 100:1): Nur das Spinsystem des L-Fucosylrestes (F, Kreis in der Formel) ist sichtbar und zeigt, dass nur dieser Teil des Tetrasaccharids Kontakte mit dem Protein hat. Für das TOCSY-Spinlogfeld wurde eine MLEV-17 Sequenz verwendet. Die Mischzeit war 60 ms. Für die Sättigung des Proteins (on-resonance: 8.8 ppm, off-resonance: 40.0 ppm) wurde eine Kaskade von 40 selektiven Gauß-Pulsen à 50 ms verwendet, wodurch eine Gesamtsättigungszeit von 2 s resultiert.

#### 2.1.6. Bindungskonstanten aus STD-NMR-Experimenten

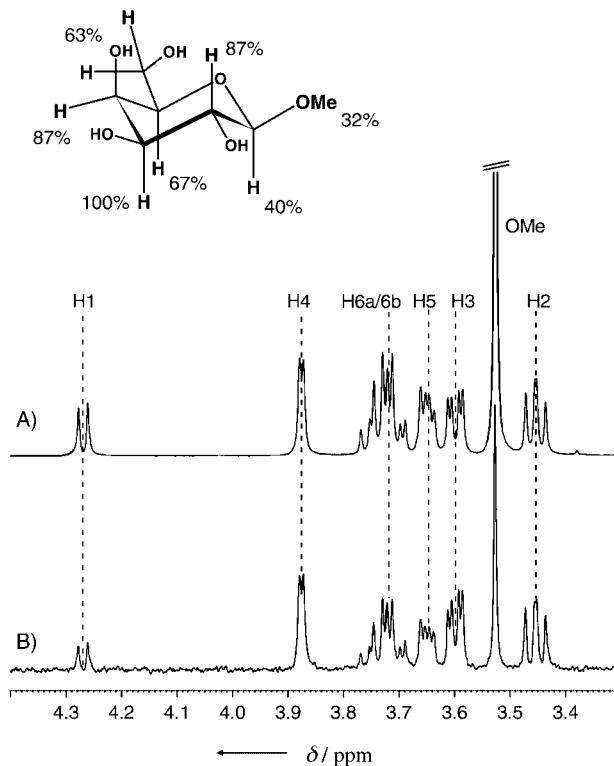
Die Bindungskonstanten von Liganden können aus STD-NMR-Spektren erhalten werden. In dem oben beschriebenen Beispiel der Bindung des Komplextyp-Decasaccharids an den Rezeptor  $\text{RCA}_{120}$  kann man eine Verdrängungstitration mit dem wesentlich schwächeren Liganden  $\beta$ -D-GalOMe durchführen. Als Resultat dieser Titration werden die STD-Verstärkungsfaktoren als Funktion der Konzentration des schwächeren Liganden erhalten. Die in Abbildung 12 gezeigten Daten belegen, dass das Decasaccharid durch das Methylgalactosid aus seiner Bindungstasche verdrängt wird. Die absolute STD-Signalintensität des  $\beta$ -D-GalOMe-Liganden steigt mit der Konzentration von 0 auf 2.5 Einheiten (STD-Verstärkungsfaktor). Die STD-Signalintensität für das Decasaccharid wird gleichzeitig von 1 auf etwa 0.66 reduziert. Dieser relativ schwache Abfall des STD-Verstärkungsfaktors für das Decasaccharid verglichen mit dem starken Anstieg der Signale des  $\beta$ -D-GalOMe zeigen deutlich, dass letzterer Ligand wesentlich schwächer als das Decasaccharid bindet. Aus dem Abfall der Signalintensität des Decasaccharids und der Bindungskonstanten des Monosaccharids kann man leicht über ein Bindungsstellen-Verdrängungsmodell die Dis-

soziationskonstante des Decasaccharids zu  $K_D = 27 \mu\text{m}$  bestimmen. Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experimente führen zu einem vergleichbaren  $K_D$ -Wert von  $4.4 \mu\text{m}$ .

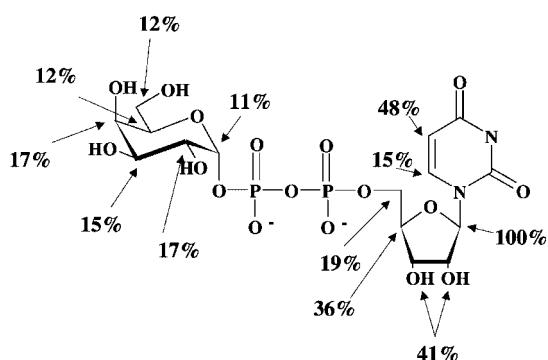
#### 2.1.7. Randbedingungen für STD-NMR-Experimente

Der STD-Effekt kann am besten interpretiert werden, wenn man den STD-Verstärkungsfaktor<sup>[58]</sup> als Maß für die Quantifizierung der Antwort des Liganden in seiner Wechselwirkung mit dem Rezeptor verwendet. Der STD-Verstärkungsfaktor wird erhalten, indem der STD-Effekt (in Prozent) mit dem Überschuss des Liganden relativ zum Proteinrezeptor multipliziert wird. Daher gibt der STD-Verstärkungsfaktor effektiv die Intensität der STD-Signale der Ligandenprotonen relativ zu einem virtuellen Proteinproton an und ist das beste Maß, um die Sensitivität der Methode abzuschätzen (Abbildung 13).

Trägt man für die Bindung von  $\beta$ -D-Methylgalactose an  $\text{RCA}_{120}$  den STD-Verstärkungsfaktor als Funktion der Sättigungszeit auf, so kann man deutlich sehen, dass sich der STD-



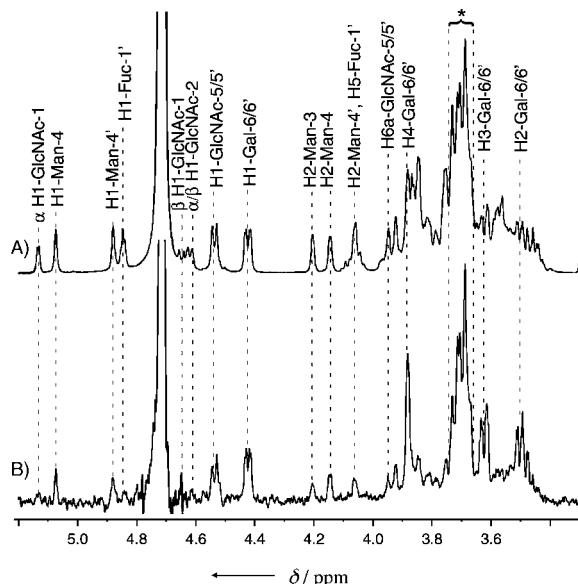
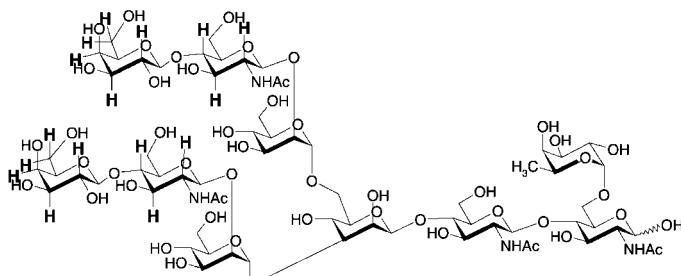
**Abbildung 10.** Oben: Struktur von  $\beta$ -D-GalOMe und der relative Grad an Sättigung der einzelnen Protonen, normalisiert auf H3 bei einem 100fachen Überschuss des Liganden. Die Konzentration von  $\text{RCA}_{120}$  war  $40 \mu\text{m}$ , die von  $\beta$ -D-GalOMe  $4 \text{ mM}$ . Unten: A) Referenz-NMR-Spektrum (Watergate Wasserunterdrückung) einer Mischung von  $\text{RCA}_{120}$  (Bindungsstellen  $40 \mu\text{m}$ ) und  $\beta$ -D-GalOMe ( $1.2 \text{ mM}$ ) in einem Verhältnis von 1:30. B) Watergate-STD-NMR-Spektrum der Probe; die On-Resonance-Sättigung wurde bei  $-0.4 \text{ ppm}$  für die Dauer von 2 s durchgeführt. Vor der Aufnahme der Spektren wurde ein  $30 \text{ ms } T_{1\mu}$ -Filter angewendet, um restliche Proteinresonanzen aus dem Spektrum zu entfernen. Aus dem STD-NMR-Spektrum lässt sich das Bindungsepitop durch Vergleich der relativen Integralintensitäten der Signale in Spektrum B) entnehmen.



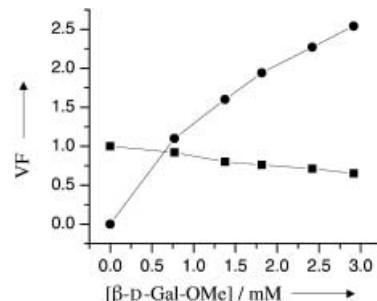
**Schema 3.** Relative-STD-Effekte von UDP-Gal gebunden an  $\beta$ 4Gal-T1. Die Werte ergeben sich aus den einzelnen Signalintensitäten im STD-NMR-Spektrum ( $I_{STD}$ ) und im Referenz-1D-NMR-Spektrum ( $I_0$ ).<sup>[73]</sup> Die Verhältnisse der Intensitäten  $I_{STD}/I_0$  sind auf den größten STD-Effekt (das Proton H1' am anomeren Zentrum der Riboseeinheit, 100%) als Referenz normiert. Pfeile zeigen die Positionen der Protonen an, die einen Gesamt-STD-Effekt zeigen. Der Wert von 41% ist dem kumulativen Sättigungstransfer nach H2' und H3' zuzuordnen. Ebenso geben 12% die Summe der Effekte für beide H6-Protonen des Galactosylrestes an. Die Werte für die Protonen H5 und H5' sind nur Schätzwerte, da eine getrennte Bestimmung der Intensitäten der Signale nicht möglich war.

Verstärkungsfaktor für H3, das direkt in die Bindung involviert ist, gegenüber dem Verstärkungsfaktor der *O*-Methylgruppe, die keinen direkten Kontakt mit dem Protein zeigt, bei einem 12fachen Überschuss des Liganden nur um einen Faktor von etwa 1.5 verändert (Abbildung 14A). Beide Kurven erreichen ihr Maximum ungefähr bei einer Sättigungszeit von 3 s. Wenn man den Überschuss des Liganden (Abbildung 14B) auf das Doppelte, also etwa 25fach, erhöht, wird auch die Diskriminierung zwischen den Protonen, die in eine direkte Bindung involviert sind, und denen, die nicht direkt mit dem Protein wechselwirken, deutlicher. In diesem Fall wird ein Faktor von etwa 2 gemessen. Bei diesem Überschuss ist selbst bei 5 s Sättigungszeit noch kein Maximum erreicht. Steigert man den Überschuss des Liganden weiter auf etwa das 100fache, so wird die absolute Größe der Antwort des Liganden etwa um einen Faktor 3 größer für Protonen, die Protonen in der Bindungstasche des Proteins wechselwirken, als für Ligandenprotonen ohne direkte Kontakte zu Proteinprotonen (Abbildung 14C).

Das Komplextyp-Decasaccharid weist eine stärkere Bindung und damit eine langsamere Austauschreaktion zwischen gebundenem und freiem Zustand auf. Daher ergeben sich geringere maximale STD-Verstärkungsfaktoren als bei dem schwächer bindenden Liganden  $\beta$ -D-Gal-OMe. Die Titrationskurve für die Bindung des Komplextyp-Decasaccharids an  $\text{RCA}_{120}$  ergibt einen maximalen STD-Verstärkungsfaktor von 2 bei einer Ligandenkonzentration von 1.2 mM. Der Grund für diese geringeren STD-Verstärkungsfaktoren ist die



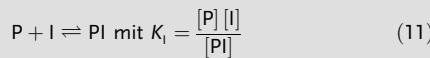
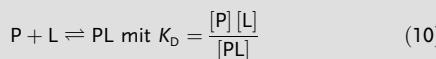
**Abbildung 11.** Oben: Struktur des Liganden: ein biantennäres Decasaccharid vom komplexen Typ ( $\text{NA}_2$ ). Die funktionellen Gruppen, die mit  $\text{RCA}_{120}$  wechselwirken sind fett hervorgehoben (bestimmt über STD-NMR-Spektroskopie). Unten: A) Ausschnitt aus dem Referenz-NMR-Spektrum des  $\text{RCA}_{120}$ -Tetramers (50  $\mu\text{M}$  Bindungsstellen) und  $\text{NA}_2$  (0.55 mM) entsprechend einem Verhältnis von 1:11. B) Im STD-NMR-Spektrum zeigen die intensivsten Signale einen direkten Kontakt von  $\text{NA}_2$  mit dem Protein an. Die Signale für die terminalen Reste Gal-6/6' und den benachbarten Resten GlcNAc-5/5' weisen die intensivsten STD-Signale auf. Im spektralen Bereich von  $\delta = 3.65$  bis 3.75 ppm (\*) finden sich intensive STD-Signale, die fast ausschließlich von H5 und H6a/6b aus Gal-6/6' und von H2, H3, und H4 aus GlcNAc-5/5' herrühren (siehe Text). Die STD-Signale für H1-Fuc-1' und  $\alpha$ -H1-GlcNAc-1 haben nur eine sehr geringe Intensität, diese Protonen sind weit von der Bindungsstelle entfernt.



**Abbildung 12.** Das Diagramm zeigt die STD-Verstärkungsfaktoren (VF; ●:  $\text{H1-}\beta\text{-D-Gal-OMe}$ , ■:  $\text{H1-Gal-6/6'-NA}_2$ ), die aus den STD-NMR-Spektren bei einer Titration von  $\beta$ -D-Gal-OMe zu einer Probe von  $\text{RCA}_{120}$  (50  $\mu\text{M}$  Bindungsstellen) und  $\text{NA}_2$  (0.55 mM) gewonnen wurden. Der STD-Verstärkungsfaktor des  $\text{NA}_2$  entsprechenden Signals fällt mit zunehmender Konzentration von  $\beta$ -D-Gal-OMe von 1 auf 0.66. Dieses Verdrängungsexperiment bestätigt die Spezifität der Bindungsaaffinität von  $\text{RCA}_{120}$  gegenüber Galactose enthaltenden Sacchariden. Der  $K_D$ -Wert von  $\text{NA}_2$  berechnet sich zu 27  $\mu\text{M}$ .

**Kasten 4: Einflüsse kompetitiver Bindung und allosterischer Effekte**

Die Bindung eines kompetitiven Inhibitors kann leicht durch die in diesem Aufsatz beschriebenen NMR-Techniken verfolgt werden. Um ein Beispiel zu geben, wird im Folgenden erklärt, wie relative  $K_D$ -Werte aus STD-NMR-Titrationen<sup>[58]</sup> erhalten werden können. Unter der Annahme einer einfachen bimolekularen Assoziationsreaktion für die Bindung des Liganden L und eines kompetitiven Inhibitors I an ein Rezeptorprotein P erhält man die simultanen Gleichgewichte (10) und (11).



Nach Cheng und Prusoff<sup>[123]</sup> kann unter diesen Bedingungen Gleichung (12) für die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für den Liganden L genutzt werden. Den Wert für  $IC_{50}$  erhält man leicht aus einer Titration

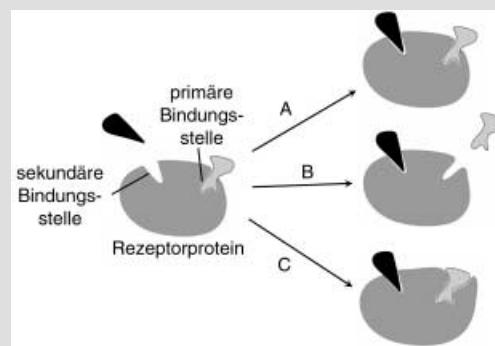
$$K_D = \frac{[L] K_I}{IC_{50} - K_I} \quad (12)$$

einer Lösung des Proteins in Gegenwart des Liganden L in einer vorgegebenen Konzentration  $[L]$  mit einem Inhibitor I.

Kompliziertere Situationen können sich ergeben, wenn Liganden an sekundäre Bindungsstellen binden. Dies kann das Ergebnis von NMR-Bindungssassays drastisch beeinflussen. Drei Extremfälle A, B und C sind im Folgenden gezeigt.

A) Die Bindungsstellen sind unabhängig: In diesem Fall werden zwei unabhängige Bindungsvorgänge durch NMR-Experimente beobachtet. Beide Bindungsstellen werden unabhängig voneinander charakterisiert. Ein "klassisches" Beispiel ist die Bindung von Liganden an das FK 506-bindende Protein (FKBP).<sup>[103]</sup>

B) Bindung eines Liganden an eine sekundäre Bindungsstelle führt zu einer allosterischen Inhibition der Ligandenbindung an die primäre Bindungsstelle: Als Konsequenz vergrößert sich der  $K_D$ -Wert

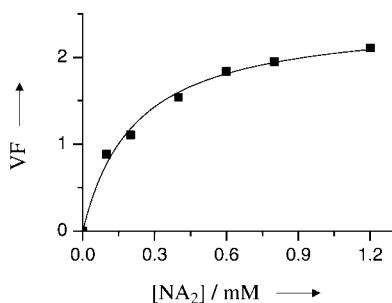


der primären Bindungsstelle. Mit STD-NMR-Titrationsexperimenten (Abschnitt 2.1)<sup>[58]</sup> in Gegenwart variierender Konzentrationen des Liganden für die sekundäre Bindungsstelle kann diese allosterische Inhibition beobachtet werden, weil ein vergrößerter scheinbarer  $K_D$ -Wert erwartet und beobachtet wird. Mit auf HSQC-beruhenden Methoden können Veränderungen der chemischen Verschiebungen im Protein, die sich bei Bindung eines Liganden an die sekundäre Bindungsstelle ergeben, beobachtet werden, während die Veränderungen der chemischen Verschiebungen, die von der Bindung von Liganden an die primäre Bindungsstelle herrühren, graduell verloren gehen.

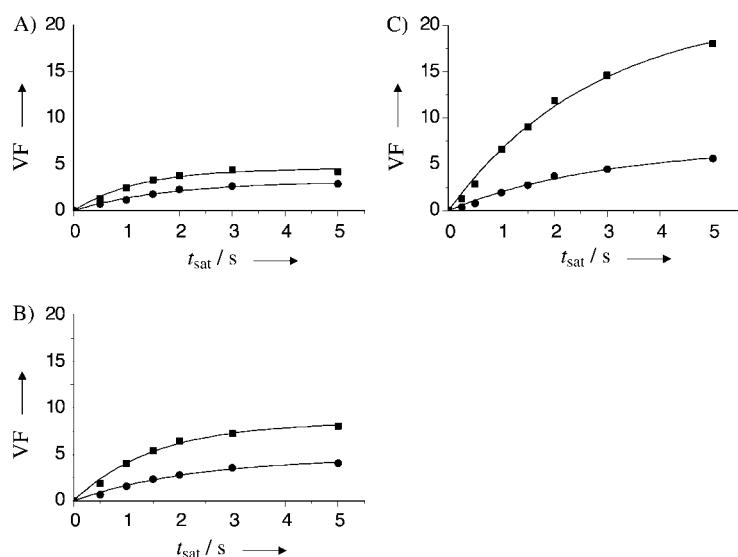
C) Bindung eines Liganden an eine sekundäre Bindungsstelle führt zu einer allosterischen Verstärkung der Bindung von Liganden an die primäre Bindungsstelle. STD-NMR-Titrationsexperimente sind geeignet, um die verstärkte Bindung in Gegenwart eines Liganden für die sekundäre Bindungsstelle zu beobachten. Bei auf HSQC-beruhenden Experimenten ist eine Zuordnung der Spektren in Gegenwart sättigender Mengen des Liganden für die sekundäre Bindungsstelle erforderlich, was dann die Charakterisierung beider Bindungsstellen erlaubt. Kürzlich durchgeführte NMR-gestützte Untersuchungen allosterischer Effekte befassen sich z. B. mit der Ligandenbindung an das Tumor-Suppressor-Protein p53<sup>[124]</sup> oder der Bindung des Lymphozyten-assoziierten Antigens 1 (LFA-1) an das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1.<sup>[125]</sup>

niedrige Dissoziationsgeschwindigkeit ( $k_{\text{diss}}$ ) dieses Liganden aus der Bindung an das Protein.

Die Beispiele zeigen, dass STD-NMR-Spektroskopie ideal geeignet ist, um direkt die Liganden zu beobachten, die mit einem makromolekularen Rezeptor wechselwirken. Durch STD-NMR-Spektroskopie können alle Typen von NMR-Spektren aufgenommen werden, da die STD-Sequenz



**Abbildung 13.** Titration einer NMR-Probe von RCA<sub>120</sub> (Konzentration der Bindungsstellen 20  $\mu\text{M}$ ) mit NA<sub>2</sub>. Der STD-Amplifikationsfaktor (VF) des H4-Gal ist gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen ( $t_{\text{sat}} = 2 \text{ s}$ ). VF =  $\frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0}$  Ligandenüberschuss.  $I_0$  = Integral des Signals eines nicht gesättigten Protons,  $I_{\text{sat}}$  = Integral des Signals eines Protons nach Sättigung.

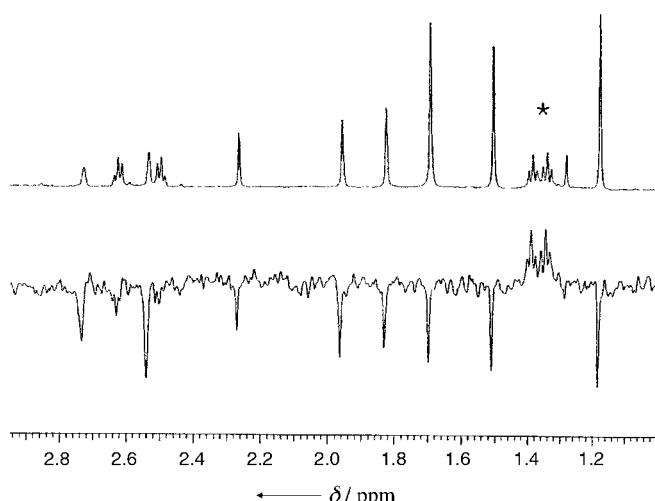


**Abbildung 14.** STD-Verstärkungsfaktoren (VF) zweier Resonanzen von Protonen des  $\beta\text{-Gal-OMe}$  als Funktion der Sättigungszeit  $t_{\text{sat}}$  bei drei verschiedenen Ligandenkonzentrationen (■: H3, ●: OMe-Protonen). A) VF bei einer Konzentration von 0.5 mM, B) 1 mM und C) 4 mM von  $\beta\text{-GalOMe}$  in Gegenwart von RCA<sub>120</sub>-Bindungsstellen (40  $\mu\text{M}$ ). Ein großer Ligandenüberschuss führt zu stärkeren STD-Intensitäten und einer besseren Diskriminierung zwischen stark und schwach bindenden Gruppen.

nur eine vorbereitende Pulssequenz ist, z.B. 1D-NMR-, TOCSY-, COSY- oder HSQC-Spektren. STD-NMR-Spektroskopie kann genutzt werden, um aus komplexen Mischungen Verbindungen mit Bindungsaktivität für einen Rezeptor herauszufiltern. Der größte Pool, der bis jetzt mithilfe von STD-NMR-Spektroskopie gescreent worden ist, enthielt ca. 250 Verbindungen. Auf der Rezeptorseite gibt es keine Obergrenze für die Masse des Proteins. Allerdings sollte das Protein nicht kleiner als etwa 10 kDa sein, da diese Proteine typischerweise nicht effizient über Spindiffusion gesättigt werden können. Zu untersuchende Rezeptorproteine können an einen festen Träger gekoppelt sein, man kann auch membranständige Proteine, beispielsweise in Liposomen integrierte Proteine, verwenden. Liganden können Monosaccharide, Oligosaccharide bis zu einem Molekulargewicht von ungefähr 2 kDa, Arene, Peptide, Peptidmimetika oder andere Moleküle sein. Einzige Voraussetzung ist, dass der Ligand in dem Lösungsmittel, in dem das Protein gelöst ist, in einer Konzentration von ungefähr 50  $\mu\text{M}$  löslich ist.

## 2.2. Water-LOGSY

Bei einer Variante der STD-NMR-Spektroskopie wird das an das Protein und den Liganden gebundene Wasser vermessen. Es hat sich gezeigt, dass gebundenes Wasser durch NMR-Spektroskopie sehr gut untersucht werden kann.<sup>[76-78]</sup> Die Beobachtung von negativen intermolekularen Wasser-Liganden-NOEs kann durch das Wasser, das sich zwischen Ligand und Protein befindet, oder durch die den Liganden umgebenden Wassermoleküle erklärt werden.<sup>[79]</sup> Basierend auf diesen Beobachtungen wurden Experimente entwickelt, mit denen es möglich ist, unter Nutzung des Wassersignals die Bindung von Liganden an das Protein zu detektieren.<sup>[80]</sup> Dabei wird entweder ein Steady-State-NOE-Experiment mit einer On-Resonance-Einstrahlung auf die Wasserresonanz oder ein transientes NOE-Experiment, bei dem die Wasserresonanz selektiv invertiert wird, durchgeführt. Ein Beispiel ist das NOE-ePHOGSY-Experiment (enhanced Protein Hydration Observed by Gradient Spectroscopy).<sup>[81]</sup> Wegen der Äquivalenz der chemischen Verschiebungen der Signale des Wassers und der  $\text{H}^\alpha$ -Atome beobachtet man einen Summeneffekt, der von beiden Quellen herröhrt. Um bei diesen Experimenten die beste Empfindlichkeit zu erhalten, werden die Untersuchungen in  $\text{H}_2\text{O}$ , das nur eine geringe Menge an  $\text{D}_2\text{O}$  enthält, durchgeführt. Um Artefakte zu eliminieren, die z.B. von Strahlungsdämpfung herröhren, wird das Wassersignal mit gepulsten Feldgradienten unterdrückt. Dies gab der Methode auch den Namen Water-LOGSY (Water-Ligand-Observation with Gradient Spectroscopy). Diese Technik wurde erfolgreich eingesetzt, um die Bindung von niedermolekularen Liganden (je 100  $\mu\text{M}$ ) an die Cyclin-abhängige Kinase 2 (cdk2, Molekulargewicht ca. 34 kDa, 10  $\mu\text{M}$ ) zu untersuchen. Aus den NMR-Spektren ergab sich eine deutliche Diskriminierung zwischen dem bindenden Liganden, einem Indolderivat, und den nicht bindenden Molekülen (Abbildung 15). Es hat sich gezeigt, dass diese Technik besonders vorteilhaft ist, wenn entweder der Ligand



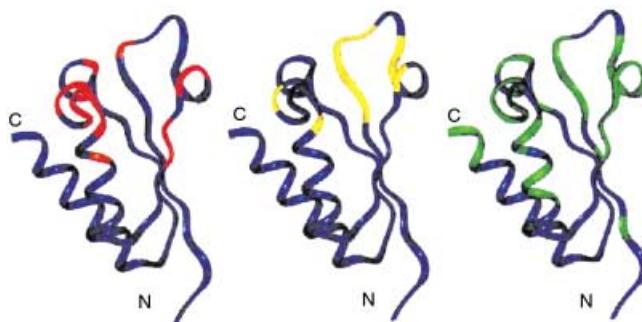
**Abbildung 15.** Water-LOGSY-Spektrum einer Bibliothek aus zehn Verbindungen in Gegenwart von cdk2 (unteres Spektrum). Die Signale des Liganden mit einer Bindungsaffinität für cdk2, ein Indolderivat, werden leicht identifiziert (positive Signale). Das obere Spektrum zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Referenzspektrum. Die die zu dem Liganden mit Bindungsaffinität gehörenden Signale sind mit einem Stern gekennzeichnet. Aus [80] mit freundlicher Genehmigung von Kluwer Academic Publishers.

oder der Rezeptor in sehr stark hydratisierter Form vorliegt, wie dies z.B. bei RNA-Ligand-Wechselwirkungen der Fall ist.

## 2.3. Kreuz-Sättigung

Kürzlich wurde gezeigt, dass man durch Kreuz-Sättigungs(Cross-Saturation)-Experimente die zu Protein-Protein-Komplexen gehörigen Bindungsstellen charakterisieren kann.<sup>[82]</sup> Dabei werden in einem Steady-State-NOE-Differenz-Experiment<sup>[14]</sup> die  $^1\text{H}$ -NMR-Resonanzen eines nicht deuterierten Proteins (Target-Resonanzen) gesättigt, was zu einem Sättigungstransfer auf die NH-Resonanzen (Reporter-Resonanzen) eines zweiten vollständig  $^{15}\text{N}$ -markierten und deuterierten Proteins führt, sofern die beiden Proteine aneinander binden. Es gibt zwei Gründe für die Deuterierung: 1) Es muss ein spektrales Fenster vorhanden sein, in dem die Zielresonanzen selektiv gesättigt werden können, und 2) hierdurch ist die Spindiffusion auf der Seite des Reporterproteins reduziert.

Da die Deuterierung eines Proteins sehr kostspielig ist und nicht immer zum gewünschten Ergebnis führt, wurde für RNA-Protein-Komplexe eine elegante Erweiterung dieser Methode vorgeschlagen.<sup>[83]</sup> Durch Nutzung des spektralen Fensters der Resonanzen von  $\text{H}1'$  des Zuckers und  $\text{H}5$  der Nucleinsäurebase bei  $\delta \approx 6$  ppm oder alternativ der Iminoprotonen mit chemischen Verschiebungen  $\delta > 12$  ppm war es möglich, einen Sättigungstransfer auf das Protein durchzuführen, der durch Differenz- $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (mit und ohne Sättigung der entsprechenden Resonanzen) sichtbar gemacht werden konnte. Für einen Komplex eines RNA-bindenden Multi-Domänen-Proteins, Nova1-KH3, in Gegen-



**Abbildung 16.** Strukturhomologie-Modell des Nova1-KH3-Proteins (SWISS-PROT) mit einer Bänderdarstellung des Proteinrückgrats. Es sind drei verschiedene Methoden zur Identifizierung der Oberflächenreste verglichen. Links: Reste, die gemäß der Kristallstrukturanalyse eines nahe verwandten Komplexes in Kontakt mit dem Liganden sind (rot). Mitte: Reste, die über Kreuz-Sättigungs-Experimente identifiziert worden sind (gelb). Rechts: Reste, die über Chemical Shift Perturbation mit HSQC-Experimenten (grün) bestimmt worden sind. Aus [83] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

wart eines 15 Nucleotide umfassenden RNA-Targetmoleküls wurde ein Kreuz-Sättigungs- $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment durchgeführt. Die Bindungsstelle der RNA auf dem Protein wurde so aufgeklärt und verglichen mit Daten, die aus den Veränderungen der chemischen Verschiebung bei der Bindung erhalten worden waren, sowie mit der röntgenographisch ermittelten Struktur für den Protein-RNA-Komplex. Das Resultat der Kreuz-Sättigungs-Experimente ist sehr ähnlich demjenigen, das man aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen erhält. Verglichen mit der aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleiteten ist die aus Letzteren abgeleitete Bindungstasche allerdings zu groß. Dies zeigt, dass der kombinierte Einsatz von Veränderungen der chemischen Verschiebungen und der Kreuz-Sättigung die Identifizierung von Interaktionsflächen auf Proteinen mit einer größeren Verlässlichkeit erlaubt. Die RNA-Bindungsstellen, die mit drei verschiedenen Methoden erhalten worden sind, sind in Abbildung 16 gezeigt.

#### 2.4. Transiente Transfer-NOE-Experimente

Üblicherweise unterscheidet man zwischen Steady-State- und transienten NOE-Experimenten. Beide Varianten sind für die Beobachtung von trNOEs anwendbar. Steady-State-Techniken sind oben diskutiert worden, und wir werden hier nur auf transiente NOE-Experimente eingehen. In transienten NOE-Experimenten werden Hochfrequenzpulse eingesetzt, die einen Nicht-Gleichgewichtszustand erzeugen. Dieser Nicht-Gleichgewichtszustand kehrt während der Mischzeit durch Relaxation in das Gleichgewicht zurück. Während dieser Zeit werden NOEs aufgebaut. Typischerweise werden 2D-NOESY-Experimente genutzt, um transiente NOEs zu messen.<sup>[14]</sup>

Während der Mischzeit bauen sich die NOEs bis zu einem Maximalwert auf und fallen danach wegen der  $T_1$ -Relaxation wieder auf null ab. In transienten trNOE-Experimenten

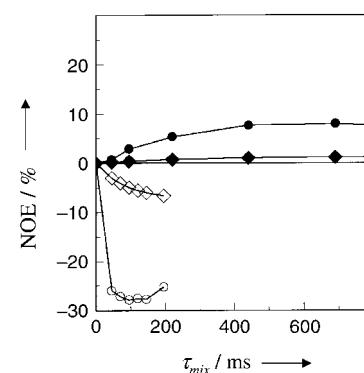
werden intra- und intermolekulare trNOEs während der Mischzeit aufgebaut. Wie bereits erwähnt, sind intramolekulare trNOEs wesentlich größer als intermolekulare Effekte. Beide Effekte wurden für die Detektion von Bindungsaktivität kleiner Moleküle genutzt.<sup>[84-89]</sup>

##### 2.4.1. Intramolekulare Transfer-NOEs

Kleine organische Moleküle zeigen normalerweise positive NOEs, die sich während der Mischzeit eines NOESY-Experimentes aufbauen. Sie erreichen ihren Maximalwert im Durchschnitt nach einigen Sekunden. Große Moleküle wie Proteine zeigen negative NOEs und erreichen das Maximum nach einer relativ kurzen Zeit, die in der Größenordnung von einigen 100 Millisekunden liegt. Bei einem Transfer-NOE-Experiment zeigen auch kleine Liganden in Lösung in Gegenwart eines großen Rezeptors, an den sie binden können, negative NOEs, die so genannten Transfer-NOEs (trNOEs). Die Eigenschaften, die sich aus der geringeren Beweglichkeit der kleineren Liganden im gebundenen Zustand ergeben, werden in die Lösung übertragen und dort über das Signal des freien Liganden detektiert.

Dadurch kann man sehr leicht Liganden, die an Proteine binden, von Molekülen unterscheiden, die nicht an Proteine binden, da bei trNOEs ein umgekehrtes Vorzeichen als bei den normalen NOEs kleiner Moleküle beobachtet wird. Weiterhin ist eine Diskriminierung aufgrund der maximalen Stärke der NOEs schon bei wenigen 100 Millisekunden möglich. Dieses Verhalten wird in Abbildung 17 für typische NOEs und trNOEs im Vergleich gezeigt.

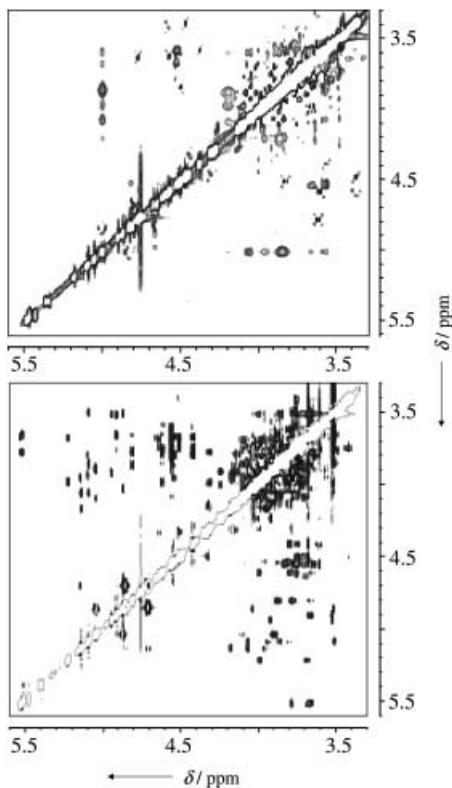
Aus dem Gesagten wird klar, dass die Mischzeit ein kritischer Parameter ist. Sie sollte so kurz wie möglich sein, sodass der Beitrag des NOE-Signals vom freien Liganden vernachlässigbar ist. Die Mischzeit muss aber andererseits so lang sein, dass sich genügend Intensität im NOE-Spektrum aufbauen kann. Neben der Mischzeit ist das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor ein weiterer kritischer Parameter.



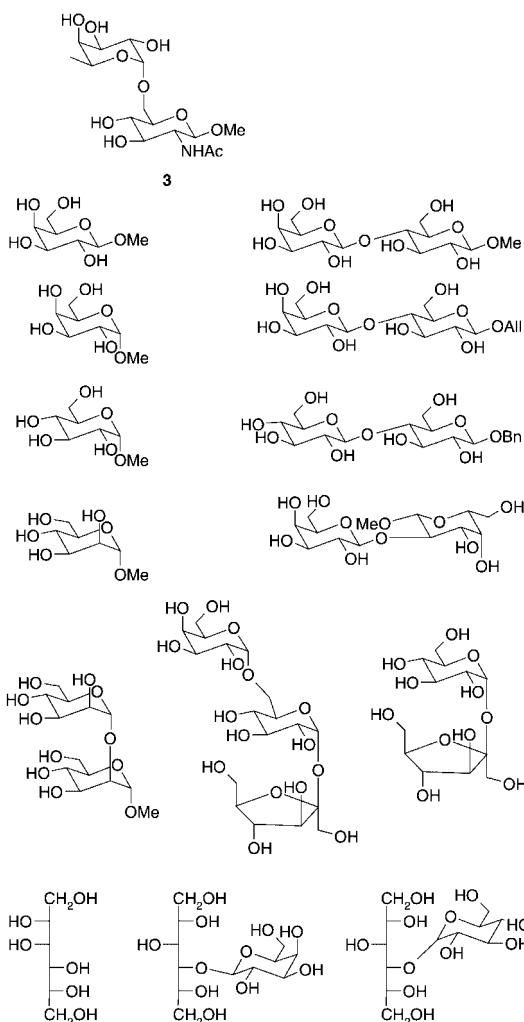
**Abbildung 17.** NOEs für freies  $\alpha$ -L-Fuc-(1→6)- $\beta$ -D-GlcNAc-OMe (gefüllte Symbole) und trNOEs für  $\alpha$ -L-Fuc-(1→6)- $\beta$ -D-GlcNAc-OMe in Gegenwart von AAA (offene Symbole), gemessen bei 600 MHz als Funktion der Mischzeit  $\tau_{\text{mix}}$ . Kreise und Rauten beziehen sich auf die Protonenpaare  $\text{H6pro}^{\text{R}^{\text{GlcNAc}}}-\text{H6pro}^{\text{S}^{\text{GlcNAc}}}$  bzw.  $\text{H1}^{\text{Fuc}}-\text{H6pro}^{\text{S}^{\text{GlcNAc}}}$ . Maximale NOEs der freien Disaccharide werden für Mischzeiten  $\tau_{\text{mix}}$  von 1000 ms gefunden, während das Maximum der trNOEs bei Mischzeiten von weniger als 300 ms erreicht wird.

In einer Vielzahl experimenteller und theoretischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit von der Kinetik und Thermodynamik des Bindungsprozesses verschiedene optimale Werte existieren. Weitere Details kann man z.B. in Lit. [30] finden. Da aber häufig weder die Dissoziationskonstanten  $K_D$  noch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{diss}}$  bekannt sind, wird üblicherweise eine Titration durchgeführt, um die trNOE-Spektren zu messen und damit mehrere Datenpunkte für den Aufbau der trNOEs zu erhalten.

Das erste Beispiel für den Einsatz von trNOESY-Experimenten zum Screening von Bibliotheken ist die Untersuchung einer Mischung von Kohlenhydraten, von denen eine Komponente Bindungsaktivität für das AAA<sup>[87,55]</sup> hat. Eine klare Unterscheidung zwischen bindenden und nicht bindenden Komponenten war aus dieser Mischung sehr schnell zu erhalten. Die verwendete Mischung ist in Schema 4 und die resultierenden trNOE-Spektren sind in Abbildung 18 gezeigt.



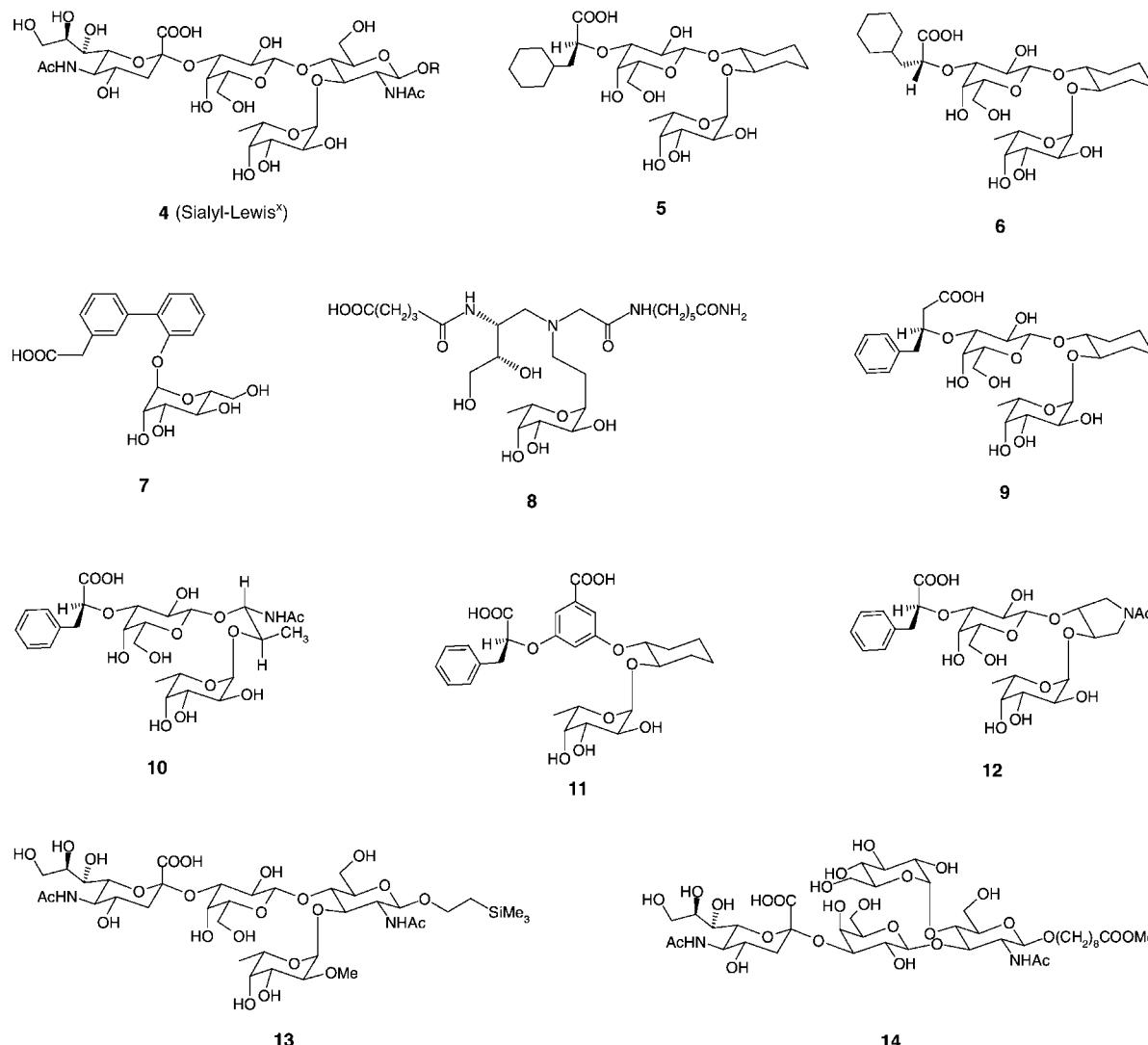
**Abbildung 18.** Unten: 2D-NOESY-Spektrum der Oligosaccharid-Bibliothek aus Schema 4. Alle Komponenten lagen je in einer Konzentration von ca. 10 mM mit einem Bindungsstellen-Liganden-Verhältnis von 1:20 vor. NOE-Kreuzsignale haben ein entgegengesetztes Vorzeichen verglichen zu den Diagonalsignalen (positive NOEs). Die Diagonale ist lediglich als eine Konturlinie gezeigt. Es ist offensichtlich, dass eine Zuordnung der Bibliothekskomponenten nicht einfach ist. Oben: 2D-trNOESY-Spektrum für die Oligosaccharid-Bibliothek in Gegenwart von AAA. Zu sehen sind die trNOE-Muster von α-L-Fuc-(1→6)-β-D-GlcNAc-OMe (3 in Schema 4). Die trNOE-Kreuzsignale haben das gleiche Vorzeichen wie die Diagonalsignale (negative NOEs). Die Spektren wurden in D<sub>2</sub>O-Lösung, bei 500 MHz und 306 K gemessen. Ein Spinlock-Filter nach dem ersten π/2-Puls wurde verwendet, um den Proteinuntergrund zu unterdrücken.



**Schema 4.** Bibliothek, die auf Bindungsaktivität gegenüber AAA getestet wurde.

Die trNOESY-Methode wurde ebenfalls erfolgreich eingesetzt, um die Bindungsaffinität einer Mischung potenzieller E-Selectin-Antagonisten zu untersuchen.<sup>[86]</sup> In diesem Fall waren vorher sich widersprechende Resultate über die Bindungsaffinität der Liganden beschrieben worden.<sup>[86]</sup> Durch trNOESY-Experimente konnte man zeigen, dass in der Bibliothek, die in Schema 5 dargestellt ist, nur das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Derivat 5 und nicht das Mimetikum 7, für das Bindungsaktivität postuliert worden war,<sup>[86]</sup> Bindungsaffinität zum E-Selectin zeigt. Abbildung 19 zeigt das NOESY- und das trNOESY-Spektrum der Bibliothek. Es ist offensichtlich, dass nur wenige Kreuzsignale ein negatives Vorzeichen haben und somit trNOEs sind. Die Kreuzsignale konnten unzweifelhaft dem Derivat 5 zugeordnet werden. Die NMR-Daten wurden parallel durch ELISA-Messungen bestätigt.

Die trNOE-Methode wurde ebenfalls eingesetzt, um die Bindungsaktivität von Furylacryloyl(fa)-Aminosäure- und Dipeptidderivaten an das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE)<sup>[85]</sup> zu untersuchen. In diesem Fall konnten die relativen Bindungsaffinitäten der Liganden direkt aus einer Mischung erhalten werden. Dies wurde durch kompetitive



**Schema 5.** Bibliothek potenzieller E-Selectin-Antagonisten. Sialyl-Lewis<sup>x</sup> ist zum Vergleich gezeigt, war jedoch nicht Bestandteil der Bibliothek.

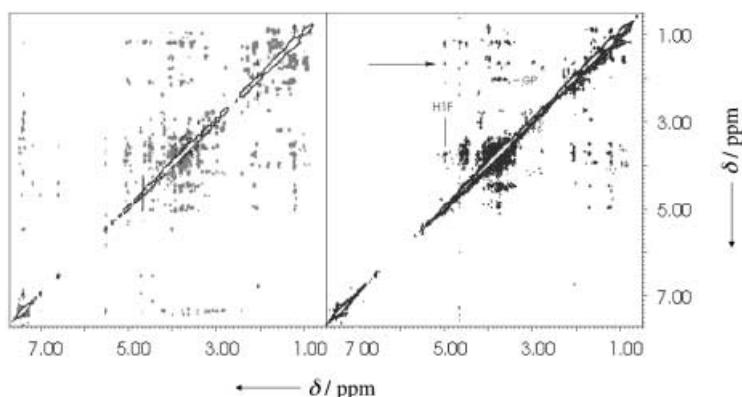
trNOESY-Experimente erreicht, indem weitere Komponenten zu der Mischung hinzugegeben wurden, während die Intensität der trNOEs einer Komponente beobachtet wurde. Es zeigte sich, dass die Furylacryloylderivate fa-Phe, fa-Trp und fa-Gly-Leu bessere Liganden als fa-Ala-Ala und fa-Phe-Phe sind und dass die Bindung dieser Verbindungen nicht mit der Bindung von Captopril an ACE konkurriert. Captopril ist bekanntermaßen ein Ligand für die S1'- und S2'-Bindungsstelle des ACE. Es wurden keine Änderungen in den trNOE-Intensitäten der fa-Aminosäuren bei der Zugabe von Captopril beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass die fa-Aminosäuren und fa-Dipeptide vorzugsweise an die S1- und S2-Tasche des Enzyms, wie in Abbildung 20 gezeigt, binden.

In dem bereits diskutierten Beispiel der Bindung von Kohlenhydratliganden in Gegenwart von AAA war der Ligand mit Bindungsaktivität das Disaccharid  $\alpha$ -L-Fuc(1-6)- $\beta$ -D-GlcNAc-OMe. Die Identifizierung der bioaktiven Komponente ist sehr leicht, wenn die NMR-Spektren aller Komponenten aus der Mischung bekannt sind. Gerade bei

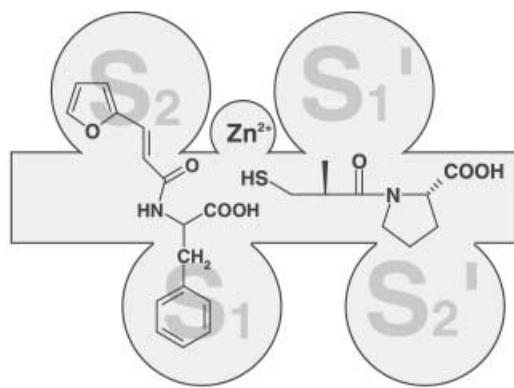
Kohlenhydraten gibt es eine Vielzahl von Isomeren. Die Identifizierung der Monosaccharideinheiten auf der Grundlage typischer chemischer Verschiebungen erlaubt üblicherweise noch keine eindeutige Zuordnung des Typs der glycosidischen Bindung. Deswegen ist ein 3D-TOCSY-trNOESY-Experiment durchgeführt worden, um die Position der glycosidischen Bindung des bioaktiven Disaccharids direkt aus der Mischung zu analysieren.<sup>[84]</sup> Dieses Experiment erlaubt tatsächlich die eindeutige Zuordnung. Wegen der langen Messzeit wird dieser Ansatz sicherlich nur von begrenztem Wert für die Analyse von Mischungen sein.

#### 2.4.2. Intermolekulare Transfer-NOEs – NOE-Pumping

Zur Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen können nicht nur intra-, sondern auch intermolekulare trNOEs genutzt werden. Unter der Voraussetzung, dass die Proteinsignale zugeordnet werden können, sind aus diesen Daten insbesondere die Orientierung der Liganden in der Bindungs-



**Abbildung 19.** Links: 2D-NOESY-Spektrum der Verbindungsverbindung aus Schema 5 in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 310 K. Die Mischzeit betrug 900 ms. Es wurden nur positive NOEs beobachtet (rot). Rechts: 2D-trNOESY-Spektrum der Verbindungsverbindung aus Schema 5 in Gegenwart von E-Selectin bei einer Mischzeit von 300 ms und einer Temperatur von 310 K. Ein Spinlock-Filter mit einer Dauer von 15 ms wurde nach dem ersten  $\pi/2$ -Puls eingesetzt. Das molare Verhältnis von Bindungsstellen zu Ligand war 1:15. Die gezeigten Kreuzsignale sind negativ (trNOEs) und können der bioaktiven Komponente 5 zugeordnet werden (siehe Schema 5). Nur negative Kreuzsignale (schwarz) sind gezeigt. Kreuzsignale, die von Spin-Diffusionen herrühren, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. GP markiert Signale, die von den Glykanketten des E-Selectins herrühren. H1F kennzeichnet die Lage des Protons am anomeren Zentrum der Fucose in 5.



**Abbildung 20.** Vorgeschlagene ACE-Bindungsstellen in Gegenwart von fa-Phe (links) und Captopril (rechts). Die Bindung von fa-Phe wurde durch die hohe Bindungsaaffinität des Inhibitors Captopril nicht beeinflusst, es hat die gleiche Bindungsaaffinität wie bei Abwesenheit eines Inhibitors.

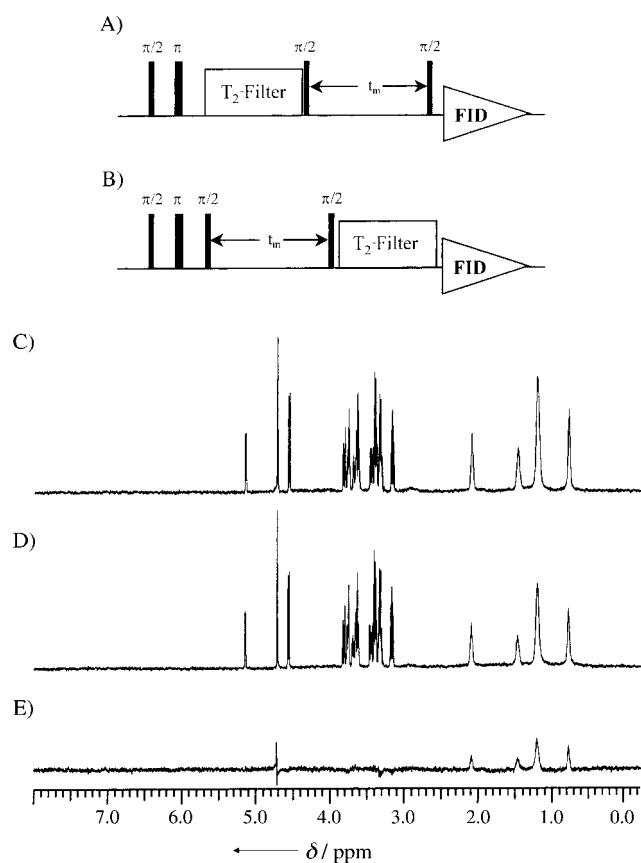
tasche zu entnehmen.<sup>[90]</sup> Solche Zuordnungen sind natürlich schwierig oder unmöglich, wenn das Rezeptorprotein groß ist ( $M_w \gtrsim 30 \text{ kDa}$ ) und nicht isotopenmarkiert vorliegt. Wenn allerdings nur Informationen über die Bindungsaktivität von Liganden gefragt sind, ist eine solche Zuordnung nicht notwendig. Bei der Analyse der gebundenen Konformationen niedermolekularer Verbindungen in trNOE-Experimenten wurde gezeigt, dass sowohl die Spindiffusion als auch ein Abfluss der Magnetisierung zum Protein die Analyse der gebundenen Konformation überlagern kann. Beide Effekte basieren auf intermolekularen NOEs zwischen dem Protein und dem Liganden. Im Falle der Spindiffusion kann man so zu falschen gebundenen Konformationen gelangen. Im Falle des

Abflusses von Magnetisierung an das Protein, die natürlich während längerer Mischzeiten deutlicher wird, werden gestrecktere Strukturen erhalten. Es sind mehrere experimentelle und theoretische Methoden entwickelt worden, um solche Effekte zu berücksichtigen.<sup>[26]</sup> Auf der anderen Seite sind diese Effekte sehr hilfreich, um Bindungsaktivität zu bestimmen. In jüngerer Zeit sind verschiedene Screening-Verfahren, die auf intermolekularen trNOEs basieren, entwickelt worden. Diese werden im Folgenden diskutiert.

Wenn ein Ligand an ein Protein bindet, so verändert er nicht nur seine Korrelationszeit, sondern auch sein Relaxationsverhalten. Protonen aus der Bindungstasche des Proteins tragen zur Relaxation der Ligandenprotonen bei und umgekehrt. Im ursprünglichen NOE-Pumping-Experiment wurde vorgeschlagen, die Signale nicht bindender Moleküle durch einen Diffusionsfilter zu unterdrücken und durch die folgende NOESY-Mischzeit Relaxationswege vom Protein zum gebundenen Liganden sichtbar zu machen. Dieses wurde durch Subtraktion dieses Spektrums von einem geeigneten Referenzspektrum erreicht.<sup>[89]</sup> In einer verbesserten Version mit dem umgekehrten experimentellen Aufbau wurde gezeigt, dass nach der Anregung ein  $T_2$ -Relaxationsfilter zur Unterdrückung von Proteinsignalen eingesetzt werden kann, dem dann die NOESY-Mischzeit folgt. Als Folge werden intermolekulare trNOEs zwischen Liganden- und Proteinprotonen unterdrückt. In einem zweiten Experiment wird ein  $T_2$ -Filter nach der Mischzeit appliziert, sodass sich während der Mischzeit intermolekulare trNOEs aufbauen und zu einer Abschwächung der Ligandensignalintensitäten führen. Das Differenzspektrum dieser beiden Experimente liefert nur Signale von Verbindungen, die mit dem Protein Kontakt hatten. Ein Beispiel für dieses inverse NOE-Pumpen ist in Abbildung 21 gezeigt. Hierbei wird die Bindung von Octansäure an humanes Serumalbumin (HSA) gezeigt. Die Methode ist eine Alternative zum STD-NMR-Experiment und kann insbesondere in den Fällen eingesetzt werden, bei denen eine selektive Sättigung des Proteins ( $< 10 \text{ kDa}$ ) nicht möglich ist.

### 3. Änderung der chemischen Verschiebungen zur Identifizierung der Ligandenbindung an Rezeptoren

Bei der Bindung eines Liganden an ein Rezeptorprotein werden die chemischen Verschiebungen der Signale beider Partner, die des Liganden und die des Proteins, verändert. Im Protein zeigen die Signale der Kerne in der Proteinbindungsstasche die größten Änderungen der chemischen Verschiebung. Protonen sind die empfindlichsten Kerne in der NMR-Spektroskopie. Daher kann man die Bindung eines Liganden an ein Protein verfolgen, indem man in  $^1\text{H}$ -detektierten Spektren die gut separierten Signale von Histidinresten in der Proteinbindungsstasche analysiert.<sup>[91–95]</sup> Theoretisch kann durch Vergleich von homonuclearen 2D-Spektren wie



**Abbildung 21.** Beispiel des inversen NOE-Pumpingss (RNP). Pulssequenz (A) generiert RNP, während Sequenz (B) für Referenzzwecke benötigt wird. Die unteren Spektren wurden für eine Probe mit 1 mM Octansäure und 1 mM Glucose in Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$  HSA erhalten. (C) Referenzspektrum, (D) RNP-Spektrum, (E) Differenzspektrum, das die Signale der Octansäure zeigt, die an HSA bindet. Aus [88] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

TOCSY-Spektren einer Probe, die nur Protein enthält, mit denen einer Probe, die Protein und Ligand enthält, eine komplett Karte der Änderungen der chemischen Verschiebungen aufgestellt werden. In der Praxis ist jedoch die eindeutige Zuordnung von Proteinprotonen, deren chemische Verschiebungen sich bei der Zugabe des Liganden geändert haben, sehr schwierig, da eine große Anzahl von Signalen überlappt. Daher ist es häufig sehr schwierig bis unmöglich, die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren. Der Einsatz heteronuclearer Korrelations-NMR-Experimente führt zu einer deutlichen Dekonvolution der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale, und die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei der Bindung von Liganden können somit in diesen Spektren sehr leicht verfolgt werden.

Für Ligandenprotonen ist die Situation eine andere, da normalerweise die Spektren von kleinen Molekülen weniger Überlappung aufweisen. Daher wird bei einigen Verfahren die Änderungen der chemischen Verschiebungen von Ligandenprotonen verwendet, um die Bindung zu charakterisieren. Eine der wesentlichen Anwendungen ist die Bestimmung von Dissoziationskonstanten aus Titrationsexperimenten. Aus der Beobachtung von Änderungen der chemischen Verschiebun-

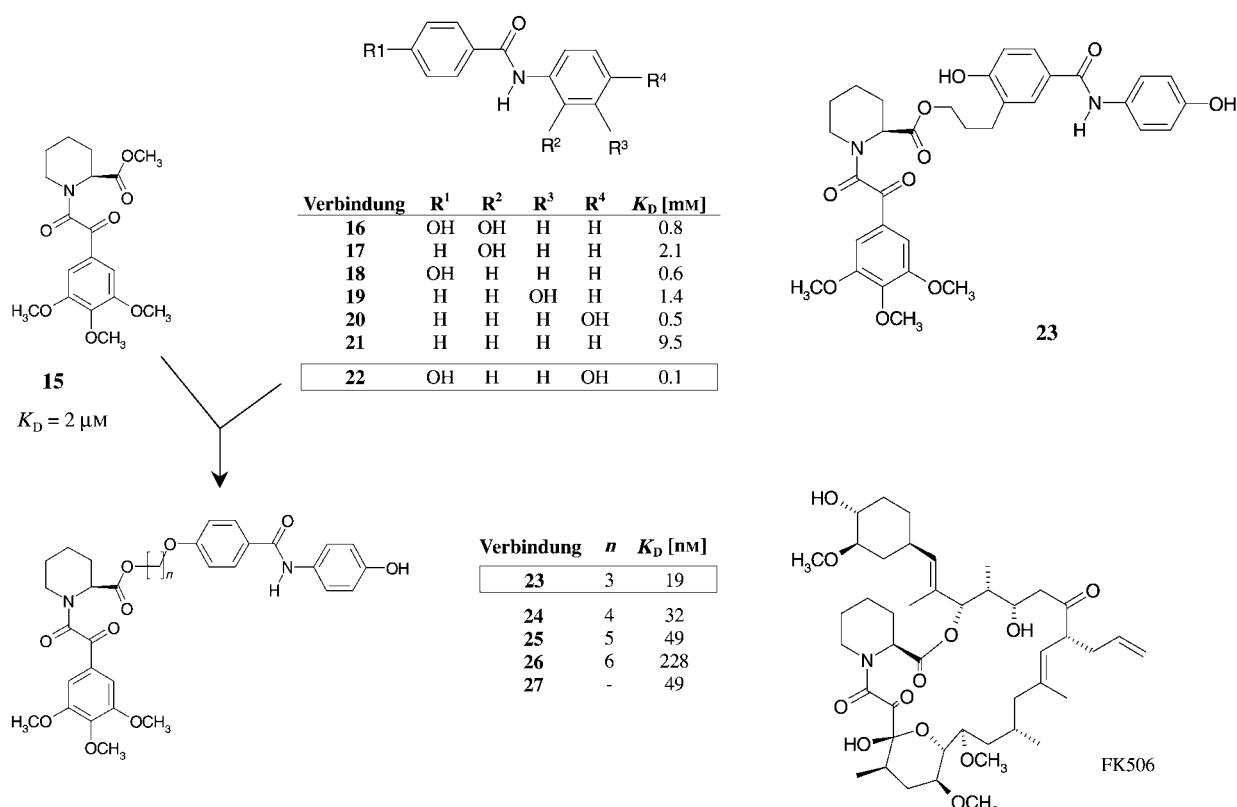
gen von Liganden signalen ist es nur schwer möglich, das Bindungsepitop zu charakterisieren oder die Bindungsaktivität in Substanzgemischen zu bestimmen. Andererseits ist die Beobachtung von Änderungen der chemischen Verschiebungen von Proteinsignalen in heteronuclearen Korrelationsspektren sehr gut möglich. Hieraus lässt sich dann sehr einfach die Bindung von Liganden charakterisieren, wie im Folgenden gezeigt wird.

### 3.1. SAR by NMR – das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment

Durch den Vergleich der  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Proben mit und ohne Liganden lässt sich sehr leicht die Bindung von Liganden an Rezeptorproteine verfolgen. Gleichzeitig können die Aminosäuren, die die Proteinbindungstasche bilden, bestimmt werden. Die Aufnahme dieser Spektren dauert im Regelfall ungefähr 10 min und liefert sehr gut separierte Resonanzsignale. Man benötigt für diese Technik ein  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein. Die Bestimmung der Bindung eines Liganden funktioniert wie folgt: Als Referenzspektrum wird ein  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins aufgenommen. Danach werden Proben, die eine oder mehrere potenzielle Liganden enthalten, hergestellt und analog vermessen. Falls die Resonanzfrequenz eines Kreuzsignals signifikant gegenüber der im Referenzspektrum verschoben ist, ist dies ein Anzeichen für Bindung.

Enthält die Probe nur einen Typ potenzieller Ligandenmoleküle, ist die Bindung dieses Liganden damit bestätigt. Wurde eine Mischung verwendet, muss die aktive Komponente noch durch Auftrennung identifiziert werden. Für Mischungen präparativen Ursprungs wie kombinatorische Bibliotheken ist dies normalerweise kein Problem, da kleinere Subbibliotheken einfach herstellbar sind. Im Fall von Naturstoffextrakten oder ähnlich komplexen Substanzgemischen unbekannter Herkunft ist die Dekonvolution der Bibliothek manchmal sehr problematisch, und die bioaktive Komponente kann nicht einfach identifiziert werden. Im Prinzip ist die Anwendung von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Experimenten zur Charakterisierung der Ligandenbindung an Proteine seit langem bekannt. So sind z.B. durch  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente die Wechselwirkungen zwischen den Guanidin gruppen von Argininresten und geladenen Gruppen des Liganden untersucht worden.<sup>[96–102]</sup> Der Wert dieser Technik für das Screening von Verbindungsbibliotheken wurde allerdings erst kürzlich entdeckt. Die erste Anwendung von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zum Screening von Liganden hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität wurde zuerst für das FK 506-bindende Protein (FKBP) beschrieben.<sup>[103]</sup>

In dieser Untersuchung mithilfe heteronuclear korrelierter Spektren wurde ein Verfahren beschrieben, für zwei voneinander separierte Bindungstaschen einen wesentlich affineren neuen Liganden zu generieren, wie dies im Folgenden erklärt wird. FKBP bindet hochaffin an Calcineurin, sobald FK 506 an FKBP (Schema 6) gebunden ist. Calcineurin spielt eine Rolle bei der Regulation einer Reihe von Transkriptionsfaktoren. Der Bindungsprozess des Calcineurins hat signifikante immunsuppressive Wirkungen. Daher ist

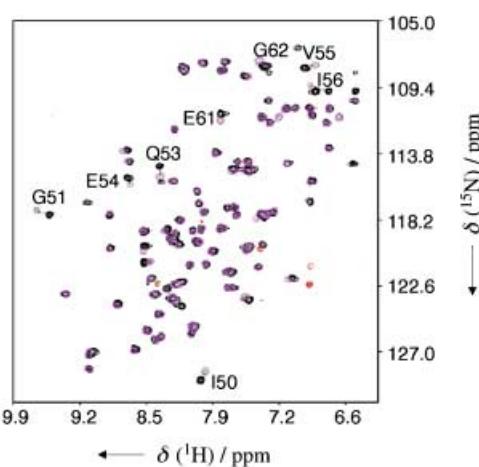


**Schema 6.** Verbindungen, die in einem  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment auf ihre FK506-analoge Bindungsaktivität getestet wurden. Aus [103] mit freundlicher Genehmigung der American Association for the Advancement of Science.

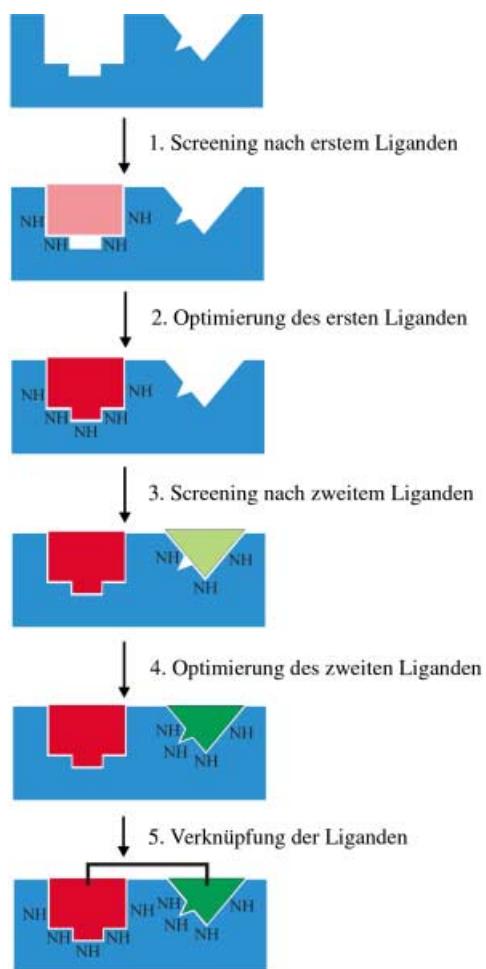
FK506 ein wichtiges Pharmakon, das z. B. die Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen unterdrücken kann. Es gibt zurzeit eine Reihe von Ansätzen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, die zwar FKBP-Bindungsaktivität haben, aber nicht die starke Toxicität des FK506 aufweisen.

Zuerst wurde eine Verbindungsbibliothek von ungefähr 1000 Substanzen auf FK506-analoge Bindungsaktivität hin untersucht. Hierzu wurde eine Lösung von vollständig  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -isotopenmarkiertem FKBP in einer Konzentration von 2 mM für HSQC-Bindungsexperimente eingesetzt. Aus dieser Bibliothek wurde die Verbindung **15** (siehe Schema 6) mit  $K_D = 2 \mu\text{M}$  identifiziert. Um die Bindungsaffinität zu verbessern, verwendeten die Autoren zwei Liganden mit moderater Affinität, die zu einem höher affinen Liganden kovalent verknüpft wurden. In einem zweiten Screening-Ansatz verwendete man den Komplex aus FKBP und dem Derivat **15**, beide Komponenten lagen in einer Konzentration von 2 mM vor, um Liganden zu suchen, die an eine zweite Bindungstasche in der Nachbarschaft der ersten binden. Auf diese Weise wurde das Benzanilidderivat **16** gefunden, das an FKBP mit einem  $K_D$  von 100  $\mu\text{M}$  bindet.  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von FKBP in Gegenwart sättigender Mengen **15**, die mit oder ohne Zusatz von **16** aufgenommen wurden, sind in Abbildung 22 gezeigt. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen zeigen eindeutig, dass **16** an eine zweite Bindungstasche bindet und nicht in Konkurrenz zu **15** steht. Um einen höheraffinen Liganden zu generieren, wurden die Fragmente **15** und **16** kovalent über verschiedene Brücken

verknüpft. Fünf unterschiedlich verknüpfte Moleküle wurden synthetisiert. Von diesen zeigte **23** die höchste Bindungsaffinität für FKBP ( $K_D = 19 \text{ nm}$ ). Die Struktur des Komplexes aus FKBP und **23** wurde detailliert NMR-spektroskopisch analysiert.<sup>[103]</sup>



**Abbildung 22.** Überlagerung eines  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von FKBP in Abwesenheit (magentafarbene Konturen) und Gegenwart (schwarze Konturen) von Verbindung **16**. Beide Spektren wurden in Gegenwart sättigender Mengen von **15** (2.0 mM) aufgenommen. Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen werden für die gekennzeichneten Reste beobachtet. Aus [103] mit freundlicher Genehmigung der American Association for the Advancement of Science.



**Schema 7.** Schematische Übersicht über die „SAR by NMR“ zur Identifizierung eines hochaffin bindenden Liganden auf der Basis zweier Ligandenfragmente, die an zwei benachbarte Bindungsstellen binden. Aus [103] mit freundlicher Genehmigung der American Association for the Advancement of Science.

„SAR by NMR“ wird in fünf Hauptschritten durchgeführt, was in Schema 7 dargestellt ist:

1. Identifizierung von Liganden mit hoher Bindungsaffinität aus einer Bibliothek von Verbindungen durch  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente.
2. Optimierung der Liganden durch chemische Modifizierung.
3. Suche nach Liganden, die in Gegenwart sättigender Mengen des ersten optimierten Liganden binden.
4. Optimierung des Liganden für die zweite Bindungstasche.
5. Kovalente Verknüpfung der zwei Liganden in unterschiedlichen Positionen und wiederum Test auf Bindung.

Normalerweise kann man durch „SAR by NMR“ aus einer Mischung von Verbindungen nicht die Identität eines Liganden mit Bindungsaffinität aufklären. Die Mischung muss daher in ihre Komponenten getrennt und diese einzeln untersucht werden. Bei ausreichender Menge an isotopenmarkiertem Protein können  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren innerhalb weniger Minuten erhalten werden. Eine Untersuchung von etwa 100 Verbindungen pro Stunde ist möglich, wenn Mischungen von jeweils etwa zehn Verbindungen eingesetzt

#### Kasten 5: Die Rolle der Bindungskinetik für HSQC-Bindungsstudien

Die Bindungskinetik spielt eine fundamentale Rolle für alle NMR-Bindungsexperimente (siehe Kasten 1). HSQC-Experimente erlauben die Detektion der Bindung von Liganden sogar für Fälle sehr langsamer Dissoziation, die normalerweise mit sehr kleinen  $K_{\text{D}}$ -Werten assoziiert sind. Tatsächlich gibt es keine untere Grenze für  $K_{\text{D}}$ , und konsequenterweise gibt es keine untere Grenze für  $k_{\text{diss}}$ . Um die potenzielle Erscheinungsform von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei Zugabe von Liganden zu analysieren, werden die Gleichungen (3)–(5) angewendet. Ein mittlerer gewichteter Mittelwert der Differenzen der  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung ist definitionsgemäß festgelegt worden [Gl. (13)].<sup>[126]</sup>

$$\delta(^1\text{H}/^{15}\text{N}) = \delta(^1\text{H}) + \delta(^{15}\text{N})/5 \quad (13)$$

Hier bezeichnet  $\Delta\delta$  die Differenz der chemischen Verschiebung des freien und gebundenen Proteins. Ein Schwellenwert von  $\Delta\delta$  ( $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ ) von 0.04 ppm wird als signifikant dafür erachtet, dass die betreffende Aminosäure an der Ligandenbindung beteiligt ist. Wenn man gleiche Beiträge der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen annimmt, sollten breite Linien mit geringer Intensität für Bindungskonstanten von 6  $\mu\text{M}$  erwartet werden (siehe Kasten 1). Für größere Differenzen in den chemischen Verschiebungen verschiebt sich der Koaleszenzpunkt zu schwächerer Bindung und umgekehrt. Für langsamere Bindungsprozesse werden separierte Signale für den gebundenen freien Zustand erwartet, während für schnellere Prozesse ein Durchschnittssignal beobachtet wird. Für Liganden mit  $K_{\text{D}}$ -Werten im  $\mu\text{M}$ - bis  $\text{mM}$ -Bereich erfordert die Methode einen Ligandenüberschuss, sodass die Bindungsstellen mit Liganden gesättigt sind.

Nach Fesik et al. ist eine 20-prozentige Besetzung der Proteinbindungsstellen für Liganden, die sich im schnellen Austausch befinden, ein Grenzwert für die Beobachtbarkeit von Änderungen der chemischen Verschiebung der Proteinprotonen in der Bindungstasche.<sup>[108]</sup> Aus den Gleichungen (6) und (8) lässt sich errechnen, dass bei einem  $K_{\text{D}}$ -Wert von 1  $\mu\text{M}$  und einer Gesamtproteinkonzentration  $[P]_0$  von 0.5  $\mu\text{M}$  eine Ligandenkonzentration  $[L]_0$  von 0.5  $\mu\text{M}$  zu einer 27-prozentigen Sättigung von Bindungsstellen führt. Bei einer Protein-Konzentration  $[P]_0$  von 0.05  $\mu\text{M}$  wird ein ca. vierfacher Überschuss an Liganden benötigt, um 16% der Bindungsstellen zu sättigen. Für das HSQC-Screening wird diese Bedingung angewendet, um die Hit-Rate durch Verringerung der Gesamtproteinkonzentration für im  $\mu\text{M}$ -Bereich bindende Substanzen zu erniedrigen.<sup>[108]</sup> Üblicherweise wird das HSQC-Screening bei gleichen Konzentrationen von Liganden und Protein durchgeführt. Daher kann ein Ligand mit einem  $K_{\text{D}}$ -Wert von 1  $\mu\text{M}$  bei einer Konzentration von 0.05  $\mu\text{M}$  sowohl des Liganden wie auch des Proteins nicht detektiert werden: Der Bruchteil besetzter Proteinbindungsstellen ist kleiner als 5%.

werden. Für die SAR-by-NMR-Methode sind relativ große Mengen an Protein und Ligand notwendig. Arbeitet man z. B. mit einem kleinen Protein mit einer Molekülmasse von 15 kDa, so werden pro NMR-Probe 7.5 mg Protein benötigt. Für 100 Proben müssen demnach etwa 750 mg des Proteins zur Verfügung stehen, wobei das Protein nach der Messung durch Dialyse oder Gelfiltration zurückgewonnen werden kann. Um mit diesem Verfahren mehr als 5000 Verbindungen pro Tag zu testen, ist es allerdings nötig, dass man Gramm-Mengen eines  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins zur Verfügung hat. Wie weiter unten gezeigt wird, lässt sich die Empfindlichkeit des SAR-by-NMR-Verfahrens durch eine Reihe von Verbesserungen steigern.

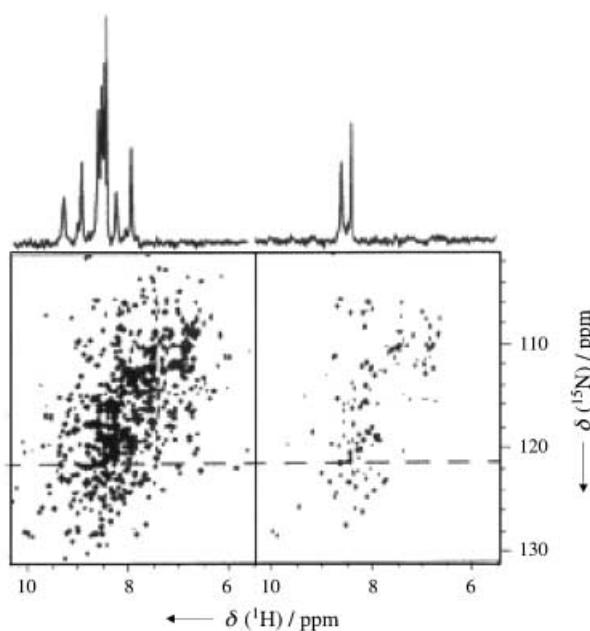
Seit der ersten Anwendung des SAR-by-NMR-Verfahrens auf FKBP ist es für die rationale Entwicklung einer

Vielzahl hochaffiner Liganden mit therapeutischer Relevanz verwendet worden. In der Zwischenzeit wurden mehrere Verbesserungen dieser Methode etabliert. Vor der Einführung des TROSY-Verfahrens (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)<sup>[104]</sup> war das Screening mithilfe von HSQC-Experimenten auf Proteine mit einer Molekülmasse von weniger als 20–30 kDa beschränkt. In TROSY-Experimenten können jedoch sehr viel größere Rezeptorproteine untersucht werden. Dennoch bleiben Probleme wegen der riesigen Zahl von Kreuzsignalen bestehen, die sich aus der Molekülgröße ergeben und für die eine Zuordnung gefunden werden muss. Es gibt Strategien zur Durchführung der Signalzuordnung und zur anschließenden Strukturanalyse großer Proteine, die aber wesentlich mehr Aufwand und Zeit erfordern. Ein interessanter Ansatz zur Vereinfachung von TROSY-Spektren ist das SEA-TROSY-Experiment (Solvent Exposed Amides by TROSY), in dem nur austauschbare Amidprotonen beobachtet werden. Diese stammen vorwiegend von Aminosäureresten in der Peripherie des Proteins, die üblicherweise auch zur Bindung von Liganden beitragen.<sup>[106,129]</sup> Durch Implementierung eines doppelten <sup>15</sup>N-Filters in Kombination mit einer Mischzeit, während derer die Magnetisierung vom Wasser auf die Amidprotonen in der Peripherie des Proteins übertragen wird, wird eine Selektion der austauschbaren NH-Resonanzen erreicht. Ein Beispiel für den erzielbaren Grad der Vereinfachung wird in Abbildung 23 für ein perdeuteriertes, <sup>15</sup>N-markiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 91 kDa gezeigt.

Eine praktische und einfache Alternative ist es, einzelne <sup>15</sup>N-markierte Aminosäuren in ein Protein einzubauen.<sup>[107]</sup> Markiert man z.B. nur Alaninreste, so ist das Zuordnungsproblem wesentlich vereinfacht. Allerdings muss für die Zuordnung der Bindungstasche des Proteins eine Vielzahl von unterschiedlichen <sup>15</sup>N-markierten Proteinen hergestellt werden, um alle beteiligten Aminosäuren prüfen zu können.

Durch den Einsatz der Kryo-Probenkopf-Technologie ist eine wesentliche Verbesserung der Empfindlichkeit bis zu einem Faktor 4 möglich.<sup>[108]</sup> In diesen Fällen kann die Konzentration des <sup>15</sup>N-markierten Targetproteins bis auf etwa 50  $\mu$ M reduziert werden. Durch die Reduktion der Proteinkonzentration ist es auch möglich, die Stringenz des Verfahrens deutlich zu erhöhen. Zusätzlich reduzieren sich entsprechend die Anforderungen an die Proteinmenge. Am Beispiel von Stromelysin als Targetprotein wurde gezeigt, dass man bei dieser Proteinkonzentration gleichzeitig bis zu 100 Verbindungen in einer Probe auf ihre Bindungsaffinität testen kann, wobei dann eine Konzentration aller Liganden zusammen von etwa 5 mM verwendet wird. Die Dekonvolution solcher Proben wird dann zuerst in Sätzen von zehn Verbindungen und danach mit Einzelverbindungen durchgeführt. Mit normalen Probenköpfen können typischerweise etwa zehn Verbindungen gleichzeitig getestet werden, sodass sich hieraus ein zehnfach erhöhter Durchsatz durch die Kryo-Probenkopftechnologie ergibt. Hiermit können ca. 200 000 Verbindungen pro Monat getestet werden, was die Dekonvolution von aktiven Bibliotheken einschließt.<sup>[108]</sup>

Eine interessante Erweiterung des HSQC-Screenings nutzt die Unterschiede in chemischen Verschiebungen strukturell nahe verwandter Liganden.<sup>[109]</sup> Es ist nicht einfach, die



**Abbildung 23.** TROSY- (links) und SEA-TROSY-<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N Korrelationspektrum (rechts) einer 0.5 mM <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-markierten P450-Reduktase, aufgenommen bei 700 MHz und 303 K. Nur Solvens-exponierte NH-Resonanzen sind in dem SEA-TROSY-Spektrum sichtbar. Aus [106] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Orientierung von Liganden in der Bindungstasche allein aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen, die aus den HSQC-Spektren erhalten werden, zu bestimmen. Docking-Algorithmen können natürlich verwendet werden, um eine Orientierung des Liganden in der Bindungstasche vorzuschlagen, was allerdings im Regelfall die Kenntnis der 3D-Struktur des Proteins voraussetzt. Eine nachfolgende NMR-spektroskopische Untersuchung ist aber notwendig, um die Orientierung des Liganden zweifelsfrei zu bestimmen. Es sollte allerdings möglich sein, die Orientierung von Liganden in der Bindungstasche zu bestimmen, wenn eine Vielzahl von strukturell ähnlichen Liganden vorhanden ist. Die Änderungen im HSQC-Spektrum sollten dann direkt die veränderten Ligandenstrukturen widerspiegeln. Mit diesem Ansatz war es möglich, die Orientierung von Ascomycin zu bestimmen, einem FK 506-Analogon, das ebenfalls an FKBP bindet.<sup>[109]</sup> Die Ähnlichkeit zwischen Liganden ist nicht nur für die Analyse der Ligandenorientierung nützlich. Beispielsweise wurde die Analyse der Bindungsdaten von elf unterschiedlichen Targetproteinen auch genutzt, um die molekularen Motive für die spezifische Bindung aufzuklären.<sup>[110]</sup> Aus dieser Betrachtung wurde gefolgert, dass das Biphenylstrukturlement gleichzeitig Bindungsaktivität und Bindungsspezifität für FKBP beinhaltet.

### 3.2. <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Experimente – selektive <sup>13</sup>C-Markierung

Im Allgemeinen ist die <sup>13</sup>C-Markierung von Proteinen wesentlich teurer als diejenige mit <sup>15</sup>N. Auch sind <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Spektren deutlich komplexer als <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren, weswegen <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Experimente bisher keine

breite Anwendung für die Untersuchung der Bindung von Liganden an Proteine gefunden haben. Um das Problem der Signalzuordnung in  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren zu reduzieren, wurde eine Markierungstechnik eingeführt, mit der selektiv die Methylgruppen von Valin-, Leucin- und Isoleucinresten markiert werden.<sup>[105]</sup> Hierbei erhöht außerdem die Gegenwart von drei Wasserstoffkernen in den Methylgruppen im Vergleich zu einem einzelnen in einer NH-Gruppe die Empfindlichkeit. Auch sind die vorteilhaften Relaxations-eigenschaften von Methylgruppen bei der HSQC-Analyse größerer Proteine hilfreich. Bei dieser Isotopenmarkierung wurde ein vorher erarbeitetes Verfahren eingesetzt, in dem vollständig  $^{13}\text{C}$ -markiertes  $\alpha$ -Ketobutyrat und  $\alpha$ -Ketoisovaleriat verwendet wurden. Über diese Verbindungen wurden vollständig protonierte Methylgruppen des Valins, Leucins und Isoleucins in ein perdeuteriertes, vollständig  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein eingeführt.<sup>[111-113]</sup> Für die Herstellung von  $[3-^{13}\text{C}]\alpha$ -Ketobutyrat und  $[3,3'-^{13}\text{C}]\alpha$ -Ketoisovalerat aus  $\text{C}^{13}$ -isotopenmarkiertem Methyliodid als  $^{13}\text{C}$ -Quelle wurde eine präparative Methode erarbeitet.<sup>[105]</sup> Mit so markierten Proteinen mit Molekulargewichten von 12 bis 110 kDa wurde dann ein  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Screening durchgeführt.

Es zeigte sich für FKBP (12 kDa) und dem Apoptose-Inhibitor Bcl-xL (19 kDa), dass die Empfindlichkeit von  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Experimenten etwa dreifach höher war als die von  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimenten. Daher lassen sich mit den  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindungen Durchsätze erreichen, die bei  $^{15}\text{N}$ -markierten Proben nur mithilfe der Kryo-Probenkopftechnologie erreicht werden können.<sup>[108]</sup> In Abbildung 24 werden  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren einer 50  $\mu\text{M}$  Probe vom  $^{13}\text{C}$ (Methyl), $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -markiertem Bcl-xL verglichen. Es ist offensichtlich, dass die  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren eine bessere Qualität aufweisen.

Als größere Proteine dienen Maltosebindendes Protein (MBP, 42 kDa) und Dihydroneopteraldolase (DHNA, 110 kDa) als Beispiele.<sup>[105]</sup> Akzeptable Durchsätze können nur mit perdeuterierten Proteinen erhalten werden. Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, sind  $^{13}\text{C}$ (Methyl)-HSQC-Experimente wesentlich empfindlicher als  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-Experimente.

Die Anwendbarkeit von  $^{13}\text{C}$ (Methyl)-Markierungsstrategien hängt eindeutig von der Gegenwart von Valin-, Leucin- oder Isoleucinresten in der Bindungstasche des Proteins ab. Eine statistische Analyse von 191 röntgenographisch bestimmten Strukturen von Proteinen mit gebundenen Ligandenmolekülen zeigte, dass 92 % der Liganden mindestens ein Schweratom in einem Abstand von weniger als 6 Å mit mindestens einer Methylgruppe von Valin-, Leucin- oder Isoleucinresten enthielten, hingegen nur 82 % der Liganden ein Schweratom mit einem Abstand von weniger als 6 Å zu einem Rückgrat-Stickstoffatom.

#### 4. Relaxationszeiten zur Identifizierung von Ligandenbindung

Die Linienverbreiterung, die durch die Bindung von Liganden an Proteine entsteht, wird schon seit langem zur Identifizierung der Ligandenbindung an Proteine genutzt.

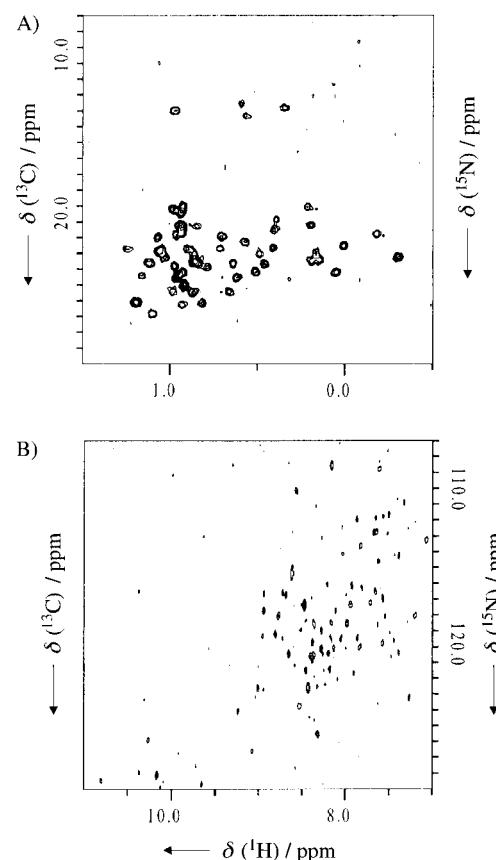


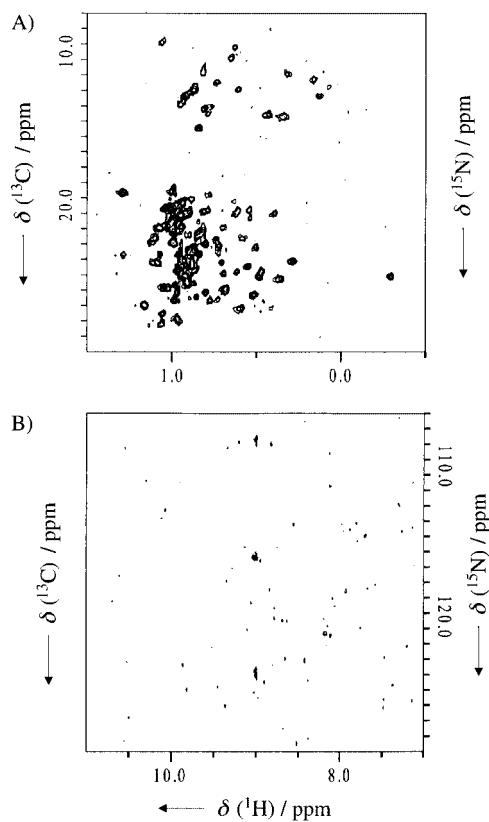
Abbildung 24. A)  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC- und B)  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von  $^{13}\text{C}$ (Methyl), $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -markiertem Bcl-xL (19 kDa) bei 500 MHz. Aus [108] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Natürlich werden für die Beobachtung und Quantifizierung solcher Effekte separierte Signale benötigt. Dies gilt insbesondere, wenn Mischungen von Verbindungen untersucht werden sollen.<sup>[8]</sup> Daher ist die Linienverbreiterung nur von einem begrenzten Wert für die Bestimmung der Bindungsaktivität von einer oder mehreren Verbindungen in komplexen Mischungen. Andere experimentelle Ansätze beruhen auf der getrennten Aufnahme von Spektren von Ligandenmolekülen mit und ohne Protein in der Lösung.<sup>[114]</sup> Die nachträgliche Subtraktion führt dann zu Spektren, die nur Beiträge des bindenden Liganden beinhalten. Diese Technik ist allerdings wegen Subtraktionsartefakten sehr schwierig anwendbar und erfordert einen hohen experimentellen Aufwand.

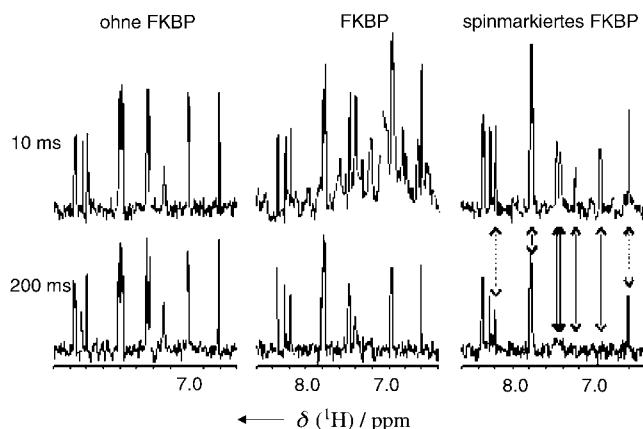
Kürzlich wurde durch Bindung eines Liganden mit einem ungepaarten Elektron an eine primäre Bindungstasche die Bindung weiterer Liganden an eine sekundäre Bindungstasche untersucht.<sup>[115]</sup> Die Gegenwart einer Spinmarkierung führt zu einer  $T_2$ -Relaxation der Liganden in der zweiten Bindungstasche, die stark von der Entfernung zu dieser Spinmarkierung abhängt. Daher sind in  $T_2$ -gefilterten NMR-Spektren die Resonanzen von Liganden, die an die zweite Bindungstasche binden, durch die schnelle  $T_2$ -Relaxation nicht sichtbar. Ein Beispiel für diesen Typ von Relaxationsfilter ist in Abbildung 26 gezeigt.

Für das Screening von Liganden für die primäre Bindungstasche wurde dieses Verfahren kürzlich erweitert, indem die Spinmarkierung kovalent an das Protein gebunden wurde.<sup>[116]</sup> Beispielsweise wurde die Bindung von niedrigaf-

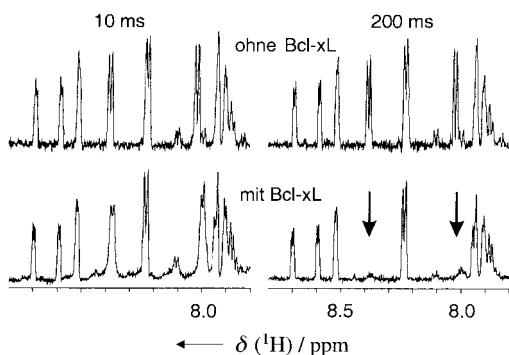
finen Liganden an FKBP untersucht. Zur Spinmarkierung wurde 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) verwendet, das kovalent an die Lysin-Seitenketten des FKBP gebunden wurde. Da mehrere Lysinreste in der Nähe der FK 506-Bindungstasche sind, werden alle Liganden, die in dieser Tasche binden, eine wesentlich gesteigertere  $T_2$ -Relaxation erfahren. Bei einer Mischung aus zwei schwach und vier nicht bindenden Liganden kann man mithilfe dieses Verfahrens zwischen bindenden und nichtbindenden Liganden diskriminieren (Abbildung 27). Da Relaxation über Elektronenspins involviert ist, erhält man durch diese Technik eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit. Grenzen werden durch die Anforderung an eine kovalente Modifikation des Proteins gesetzt, die auch die Bindungsaffinität beeinflussen kann und dadurch, dass ein Lysinrest nahe an der Bindungstasche lokalisiert sein muss.



**Abbildung 25.** A)  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC- und B)  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von  $^{13}\text{C}$ (Methyl),[ $^1\text{U}^{15}\text{N}$ ]-markiertem MBP (50  $\mu\text{M}$ , 42 kDa) bei 800 MHz. Aus [105] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.



**Abbildung 27.**  $T_{1\rho}$ -Relaxationsexperimente mit zwei bindenden und vier nicht bindenden Komponenten ohne FKBP (links, 60  $\mu\text{M}$ ), in Gegenwart von unmarkiertem FKBP (Mitte) und spinmarkiertem FKBP (rechts, 20  $\mu\text{M}$ ). Die Spinlock-Zeiten betragen 10 ms in der oberen und 200 ms in der unteren Zeile. Pfeile markieren das Verschwinden von Signalen, die von Verbindungen mit Bindungsaktivität für FKBP herrühren. Aus [116] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.



**Abbildung 26.** Spektren einer Mischung potenzieller Liganden, die an die zweite Bindungstasche von Bcl-xL binden. Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Referenzspektrum, unten:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Verbindungsmischung in Gegenwart von Bcl-xL und sättigenden Mengen eines spinmarkierten ersten Liganden. Die Dauer des  $T_2$ -Filters war 10 (links) bzw. 200 ms (rechts). Die Pfeile markieren die Signale, die durch schnelle Relaxation verschwinden. Aus [115] mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

## 5. Diffusion zur Identifizierung von Ligandenbindung

Mit der Entwicklung von zuverlässiger Gradiententechnik für die hochauflösende NMR-Spektroskopie wurde die Untersuchung von Diffusionsprozessen durch NMR-Spektroskopie möglich. Eine Vielzahl von NMR-Pulssequenzen wurde entwickelt, um Diffusionskonstanten in Lösung zu bestimmen. Auf der Basis solcher Experimente ist es möglich, Verbindungen in Mischungen nach ihren Diffusionseigenschaften zu unterscheiden. Dieses so genannte Diffusions-Editieren wurde erfolgreich auf die Dekonvolution von Verbindungsmischungen angewendet, um molekulare Assoziationsprozesse zu charakterisieren.<sup>[114,117-121]</sup> Für kleine und mittelgroße Moleküle funktioniert dieser Ansatz gut, und im Prinzip kann das Diffusions-Editieren auch für die Detektion der Bindung von niedermolekularen Verbindungen an große Proteinrezeptoren genutzt werden. Ein Ansatz basiert

**Tabelle 2:** NMR-spektroskopische Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung der Bindung von Liganden an Proteine.

	„SAR by NMR“	STD-NMR	Spin-Markierung	Diffusions-Editieren	inverses NOE-Pumping	Water-LOGSY
großes Protein > 30 kDa	begrenzt <sup>[a]</sup>	ja	ja	nein	ja	ja
kleines Protein < 10 kDa	ja	nein	ja	ja	nein	nein
isotopenmarkiertes Protein erforderlich	ja	nein	nein <sup>[b]</sup>	nein	nein	nein
Bindungsepitop auf dem Protein	ja <sup>[c]</sup>	nein	nein	nein	nein	nein
Bindungsepitop des Liganden	nein	ja	nein	nein	ja <sup>[d]</sup>	ja <sup>[e]</sup>
Menge an Protein [nmol] bei 500 MHz	25	0.1	~1	~100	~25	~25
$K_D$ starke Bindung	keine Grenze	100 pM	100 pM	~100 nM	1 nM	100 pM
$K_D$ schwache Bindung	~1 mM	~10 mM	~10 mM	~1 mM	~1 mM	~10 mM
Identifizierung von Liganden	nein	ja	ja	ja	ja	ja
Kommentar	robustes Verfahren	robustes Verfahren	sensitive Methode, aber nicht eindeutig wenn Lys-Positionen unbekannt	relativ unempfindliche Methode	stabile Methode, aber Optimierung von Ligandenüberschuss und Mischzeit	gut für hydrophile Targets und/oder Liganden

[a] TROSY notwendig. [b] Chemische Modifizierung notwendig. [c] Erfordert Zuordnung des Proteins. [d] Bisher nicht durchgeführt. [e] Aber Kontakt mit Wasser.

darauf, verschiedene Proben der Ligandenmischung mit und ohne Protein herzustellen und zu vermessen<sup>[114]</sup> (siehe auch Abschnitt 3.5). Die Differenz dieser Diffusions-editierten Spektren liefert dann Informationen über die Bindungsaffinität.

Bei der Anwendung dieser Technik ist es schwierig, Artefakte zu vermeiden, da man zwei identische Proben herstellen muss. Die Hauptschwierigkeit liegt aber in der Detektion von Änderungen der Diffusionskonstanten des Liganden, der an das Protein bindet, da eine signifikante Menge des Liganden im zeitlichen Mittel an das Protein gebunden sein muss. Dies beruht darauf, dass nur die gemittelte Diffusionskonstante beobachtet wird, die sich aus der Summe des Bruchteils des freien Liganden, multipliziert mit dessen Diffusionskonstante, und des Bruchteils des gebundenen Liganden, multipliziert mit dessen Diffusionskonstante, ergibt. Daher führt eine Zunahme des Überschusses an Ligandenmolekülen zu kleinen Änderungen der Diffusionskonstante, die auf den Bindungsprozess zurückzuführen sind. Es zeigt sich, dass niedrige Liganden-Protein-Verhältnisse benötigt werden, um die Bindung auf der Basis von gemittelten Diffusionskonstanten detektieren zu können. Die Größe des Targetproteins ist begrenzt, da die Mittelung der Linienbreiten von freien und gebundenen Liganden in zu breiten Linien des Liganden resultieren würden, wenn dieser Ligand an ein sehr großes Protein binden würde. Bei niedrigen Ligand-Protein-Verhältnissen können keine einzelnen Signale des Liganden identifiziert werden, da die Linien eine zu starke Verbreiterung zeigen. Das Diffusions-Editieren ist ein wertvolles Werkzeug, um molekulare Wechselwirkungen zwischen kleinen und mittelgroßen Molekülen zu charakterisieren.

## 6. Bedingungen für das NMR-Screening und die Charakterisierung der Ligandenbindung

Eine Vielzahl von Kriterien muss berücksichtigt werden, um das richtige NMR-spektroskopische Verfahren für die Identifizierung und Charakterisierung der Bindung von Liganden an Proteine zu wählen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Verfahren. Die meisten Daten in dieser Tabelle stammen aus der Literatur, einige wurden von uns extrapoliert.

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden unterstützt durch das BMBF (FKZ 0311361), die DFG, den Sonderforschungsbereich 470 (Projekte B2 und B3), das Graduiertenkolleg 464 sowie durch den Fonds der Chemischen Industrie. Wir danken weiterhin Dr. T. Keller und Dr. G. Wolff, Bruker Biospin GmbH (Rheinstetten, Deutschland), für ihre Unterstützung.

Eingegangen am 14. Februar 2002 [A518]

- [1] T. Diercks, M. Coles, H. Kessler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 285–291.
- [2] M. Shapiro, *Farmaco* **2001**, 56, 141–143.
- [3] D. J. Craik, M. J. Scanlon, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2000**, 42, 115–174.
- [4] D. C. Fry, S. D. Emerson, *Drug Des. Discovery* **2000**, 17, 13–33.
- [5] G. C. Roberts, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 230–240.
- [6] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *ACS Symp. Ser.* **1999**, 719, 226–238.
- [7] P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, 32, 211–240.
- [8] J. M. Moore, *Biopolymers* **1999**, 51, 221–243.

## Kasten 6: Diffusions-Editieren als Werkzeug für die Detektion der Bindung kleiner Moleküle an Rezeptorproteine

NMR-Experimente sind gut geeignet für die Bestimmung der Diffusionskonstanten von Molekülen und insbesondere für die Beobachtung der Assoziation kleiner Moleküle mit anderen Molekülen mit einem Molekulargewicht von bis zu einigen kDa sowie für die Bestimmung von  $K_D$ -Werten. Die Bindung kleiner Moleküle an große Rezeptorproteine, die häufig das Molekulargewicht von 100 kDa überschreiten, lässt sich nicht so leicht mithilfe Diffusions-editierter NMR-Spektroskopie bestimmen. Auch wenn die Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit eines kleinen Moleküls durch Bindung an ein großes Rezeptorprotein drastisch geändert wird, ist es schwer, die Resonanzen der Ligandenprotonen bei den erforderlichen niedrigen Ligand-zu-Protein-Verhältnissen zu beobachten, da es zu starken Linienverbreiterungen kommt. Eine Lösung ist die Anwendung großer Ligandenüberschüsse, was jedoch zu einer Reduktion des beobachteten Unterschiedes in den Diffusionskoeffizienten bei Bindung führt, da ein linearer Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient und dem Molenbruch  $x$  des gebundenen und freien Liganden,  $x_{\text{geb}}$  und  $x_{\text{frei}}$ , besteht [Gl. (14)].

$$D_{\text{beob}} = x_{\text{frei}} D_{\text{frei}} + x_{\text{geb}} D_{\text{geb}} \quad (14)$$

Aus dieser einfachen linearen Beziehung ergibt sich, dass die besten Ergebnisse bei einer hohen Proteinkonzentration, z. B. im mM-Bereich, erhalten werden. Ein einfaches Beispiel soll diesen Punkt illustrieren. Ein Rezeptorprotein mit dem Molekulargewicht von 100 kDa weist einen Diffusionskoeffizienten von ca.  $2 \times 10^7$  auf. Der entsprechende Ligand soll ein Molekulargewicht von 1 kDa aufweisen und einen Diffusionskoeffizienten von ca.  $20 \times 10^7$ . Bei Annahme eines  $K_D$ -Wertes von  $1 \mu\text{M}$  und einer Proteinkonzentration von  $0.1 \text{ mM}$  ergibt sich bei einer Ligandenkonzentration von  $0.1 \text{ mM}$ , dass ca. 90% aller Bindungsstellen besetzt sind. Nach Gleichung (14) führt dies zu einer signifikanten Änderung des beobachteten Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{beob}}$  [Gl. (15)].

$$D_{\text{beob}} = 0.1 \times 20 \times 10^7 + 0.9 \times 2 \times 10^7 = 3.8 \times 10^7 \quad (15)$$

Bei einer erhöhten Ligandenkonzentration von  $1 \text{ mM}$  sind ca. 99.9% aller Bindungsstellen besetzt. Andererseits führt dieser zehnfache Ligandenüberschuss an Liganden zu einem 10% geringeren Beitrag von  $D_{\text{geb}}$  zu  $D_{\text{beob}}$ . Es wird ein Wert von ca.  $18 \times 10^7$  für  $D_{\text{beob}}$  erwartet, wohingegen  $D_{\text{frei}}$  für den freien Liganden  $20 \times 10^7$  beträgt. Die Situation wird ungünstiger für noch weiter steigende Ligandenkonzentrationen. Daher sind generell relativ große Mengen an Protein für diese Technik erforderlich.

- [9] J. M. Moore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 54–58.
- [10] M. J. Shapiro, J. S. Gounaris, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 153–200.
- [11] M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1999**, *2*, 396–400.
- [12] D. C. Schriemer, O. Hindsgaul, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **1998**, *1*, 155–170.
- [13] P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1997**, *278*, 497–499.
- [14] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, Wiley-VCH, **2000**.
- [15] K. Wüthrich, G. Wagner, R. Richarz, S. J. Perkins, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2253–2263.
- [16] N. R. Krishna, D. G. Agresti, J. D. Glickson, R. Walter, *Biophys. J.* **1978**, *24*, 791–814.
- [17] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1–6.
- [18] W. Braun, C. Bosch, L. R. Brown, N. Go, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *667*, 377–396.

- [19] G. Wagner, W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, N. Go, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611–639.
- [20] A. Bax, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 223–256.
- [21] P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4017–4018.
- [22] P. Balaram, A. A. Bothner-By, J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4015–4017.
- [23] J. P. Albrant, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, *1*, 37–41.
- [24] G. M. Clore, A. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 423–442.
- [25] J. Feeney, B. Birdsall, G. C. Roberts, A. S. Burgen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 628–633.
- [26] N. R. Krishna, H. N. B. Moseley in *Structural Computation and Dynamics in Protein NMR*, Vol. 17 (Hrsg.: N. R. Krishna, L. J. Berliner), Kluwer Academic, New York, **1999**, S. 223–307.
- [27] R. E. London, *J. Magn. Reson.* **1999**, *141*, 301–311.
- [28] J. Jimenez-Barbero, J. L. Asensio, F. J. Canada, A. Poveda, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 549–555.
- [29] T. Peters, B. M. Pinto, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 710–720.
- [30] F. Ni, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 517–606.
- [31] D. Li, L. A. Levy, S. A. Gabel, M. S. Lebetkin, E. F. DeRose, M. J. Wall, E. E. Howell, R. E. London, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4242–4252.
- [32] H. N. Moseley, W. Lee, C. H. Arrowsmith, N. R. Krishna, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5293–5299.
- [33] R. M. Keller, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *533*, 195–208.
- [34] P. J. Cayley, J. P. Albrant, J. Feeney, G. C. Roberts, E. A. Piper, A. S. Burgen, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3886–3895.
- [35] R. M. Keller, D. Picot, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *580*, 259–265.
- [36] G. M. Smith, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1628–1634.
- [37] B. Birdsall, J. Feeney, G. C. Roberts, A. S. Burgen, *FEBS Lett.* **1980**, *120*, 107–109.
- [38] D. Cheshnovsky, G. Navon, *Biochemistry* **1980**, *19*, 1866–1873.
- [39] E. I. Hyde, B. Birdsall, G. C. Roberts, J. Feeney, A. S. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3738–3746.
- [40] J. R. Kalman, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 906–912.
- [41] R. M. Keller, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *621*, 204–217.
- [42] J. Feeney, B. Birdsall, J. P. Albrant, G. C. Roberts, A. S. Burgen, P. A. Charlton, D. W. Young, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1837–1842.
- [43] D. G. Gorenstein, D. O. Shah, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4679–4686.
- [44] B. Birdsall, G. C. Roberts, J. Feeney, J. G. Dann, A. S. Burgen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5597–5604.
- [45] D. G. Reid, S. A. Salisbury, D. H. Williams, *Biochemistry* **1983**, *22*, 1377–1385.
- [46] H. Senn, K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *743*, 69–81.
- [47] R. E. Cohen, H. K. Schachman, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2623–2631.
- [48] M. Ikura, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *872*, 195–200.
- [49] L. B. Dugad, J. T. Gerig, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4310–4316.
- [50] A. M. Petros, V. Ramesh, M. Llinas, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1368–1376.
- [51] G. N. La Mar, G. Hernandez, J. S. de Ropp, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9158–9168.
- [52] K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* **1979**, *36*, 135–140.
- [53] L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1727–1736.
- [54] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.

- [55] „Verfahren zum Nachweis biologisch aktiver Substanzen in Substanzbibliotheken“: T. Peters, B. Meyer, German Pat. No. 19 649 359, Swiss Pat. No. 690 695, US Pat. No. 6 214 561, GB Pat. No. GB 2 321 104 **1996**.
- [56] M. Vogtherr, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6093–6099.
- [57] T. Haselhorst, T. Weimar, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10 705–10 714.
- [58] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [59] H. Maaheimo, P. Kosma, L. Brade, H. Brade, T. Peters, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12 778–12 788.
- [60] J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336–5337.
- [61] R. Meinecke, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3059–3065.
- [62] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Muller, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20 233–20 238.
- [63] N. Verdaguer, D. Blaas, I. Fita, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 1179–1194.
- [64] P. R. Kolatkar, J. Bella, N. H. Olson, C. M. Bator, T. S. Baker, M. G. Rossmann, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6249–6259.
- [65] J. M. Casasnovas, T. Stehle, J. H. Liu, J. H. Wang, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4134–4139.
- [66] Z. Che, N. H. Olson, D. Leippe, W. M. Lee, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, T. S. Baker, T. J. Smith, *J. Virol.* **1998**, *72*, 4610–4622.
- [67] E. A. Hewat, T. C. Marlovits, D. Blaas, *J. Virol.* **1998**, *72*, 4396–4402.
- [68] R. Zhao, D. C. Pevear, M. J. Kremer, V. L. Giranda, J. A. Kofron, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, *Structure* **1996**, *4*, 1205–1220.
- [69] J. M. Rogers, G. D. Diana, M. A. McKinlay, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *458*, 69–76.
- [70] A. Billich, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *1*, 303–307.
- [71] a) J. E. Hanson, N. K. Sauter, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Virology* **1992**, *189*, 525–533; b) A. Benie, R. Moser, E. Bäuml, D. Blaas, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14–15.
- [72] O. Kooistra, L. Herfurth, E. Lüneberg, M. Frosch, T. Peters, U. Zähringer, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 573–582.
- [73] a) M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Glycobiology* **1991**, *1*, 205–209; b) T. Biet, T. Peters, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4320–4323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4189–4192.
- [74] G. Srivastava, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 137–144.
- [75] B. Ramakrishnan, P. K. Qasba, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 205–218.
- [76] G. Otting, E. Liepinsh, B. T. Farmer, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 209–215.
- [77] G. Otting, E. Liepinsh, K. Wüthrich, *Science* **1991**, *254*, 974–980.
- [78] G. Otting, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 259–285.
- [79] C. Dalvit, S. Cottens, P. Ramage, U. Hommel, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 43–50.
- [80] C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundstrom, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65–68.
- [81] I. Bertini, C. Dalvit, J. G. Huber, C. Luchinat, M. Piccioli, *FEBS Lett.* **1997**, *415*, 45–48.
- [82] H. Takahashi, T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata, I. Shimada, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 220–223.
- [83] A. Ramos, G. Kelly, D. Hollingworth, A. Pastore, T. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11 311–11 314.
- [84] L. Herfurth, T. Weimar, T. Peters, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2097–2099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2097–2099.
- [85] M. Mayer, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2093–2099.
- [86] D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W. T. Wang, B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 98–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 98–102.
- [87] B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705–709.
- [88] A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 414–415.
- [89] A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10 258–10 259.
- [90] M. J. Gradwell, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **1996**, *7*, 48–58.
- [91] J. Feeney, G. Batchelor, J. P. Albrand, G. C. K. Roberts, *J. Magn. Reson.* **1979**, *33*, 519–529.
- [92] J. Feeney, G. C. Roberts, J. W. Thomson, R. W. King, D. V. Griffiths, A. S. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2316–2321.
- [93] B. Birdsall, J. Feeney, C. Pascual, G. C. Roberts, I. Kompis, R. L. Then, K. Muller, A. Kroehn, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1672–1676.
- [94] L. Y. Lian, G. C. K. Roberts in *NMR of Macromolecules* (Hrsg.: G. C. K. Roberts), Oxford University Press, Oxford, **1993**, S. 153–182.
- [95] L. Y. Lian, I. L. Barsukov, M. J. Sutcliffe, K. H. Sze, G. C. Roberts, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 657–700.
- [96] S. M. Pascal, T. Yamazaki, A. U. Singer, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11 353–11 362.
- [97] T. Yamazaki, S. M. Pascal, A. U. Singer, J. Forman-Kay, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3556–3564.
- [98] M.-H. Feng, M. Philippopoulos, A. D. McKerell, Jr., C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11 265–11 277.
- [99] A. R. Gargaro, T. A. Frenkiel, P. M. Nieto, B. Birdsall, V. I. Polshakov, W. D. Morgan, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 435–439.
- [100] P. M. Nieto, B. Birdsall, W. D. Morgan, T. A. Frenkiel, A. R. Gargaro, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 16–20.
- [101] W. D. Morgan, B. Birdsall, P. M. Nieto, A. R. Gargaro, J. Feeney, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2127–2134.
- [102] V. I. Polshakov, W. D. Morgan, B. Birdsall, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 115–122.
- [103] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [104] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12 366–12 371.
- [105] P. J. Hajduk, D. J. Augeri, J. Mack, R. Mendoza, J. Yang, S. F. Betz, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7898–7904.
- [106] M. Pellecchia, D. Meininger, A. L. Shen, R. Jack, C. B. Kasper, D. S. Sem, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4633–4634.
- [107] M. Kainosho, T. Tsuji, *Biochemistry* **1982**, *21*, 6273–6279.
- [108] P. J. Hajduk, T. Gerfin, J. M. Boehlen, M. Haberli, D. Marek, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2315–2317.
- [109] A. Medek, P. J. Hajduk, J. Mack, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1241–1242.
- [110] P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3443–3447.
- [111] K. H. Gardner, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7599–7600.
- [112] K. H. Gardner, X. C. Zhang, K. Gehring, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11 738–11 748.
- [113] N. K. Goto, K. H. Gardner, G. A. Mueller, R. C. Willis, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369–374.
- [114] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12 257–12 261.
- [115] W. Jahnke, L. B. Perez, C. G. Paris, A. Strauss, G. Fendrich, C. M. Nalin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7394–7395.
- [116] W. Jahnke, S. Ruedisser, M. Zurini, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3149–3150.
- [117] M. Lin, M. J. Shapiro, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7617–7619.
- [118] M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8930–8931.
- [119] M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5249–5250.
- [120] K. Bleicher, M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8486–8490.

- [121] R. C. Anderson, M. Lin, M. J. Shapiro, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 69–72.
- [122] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [123] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [124] P. V. Nikolova, K.-B. Wong, B. DeDecker, J. Henckel, A. R. Fersht, *EMBO J.* **2000**, *19*, 370–378.
- [125] J. R. Huth, E. T. Olejniczak, R. Mendoza, H. Liang, E. A. S. Harris, M. L. Luper, Jr., A. E. Wilson, S. W. Fesik, D. E. Staunton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5231–5236.
- [126] P. J. Hajduk, J. Dinges, G. F. Miknis, M. Merlock, T. Middleton, D. J. Kempf, D. A. Egan, K. A. Walter, T. S. Robins, S. B. Shuker, T. F. Holzman, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3144–3150.
- [127] R. Freeman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 59–106.
- [128] V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 106–118.
- [129] G. Gemmecker, W. Jahnke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11620–11621.
- [130] L. Bhattacharyya, C. F. Brewer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*, 207–212.
- [131] S. Sharma, S. Bharadwaj, A. Surolia, S. K. Podder, *Biochem. J.* **1998**, *333*, 539–542.

# Quality counts...

The best of chemistry every week



**Wiley-VCH**

P.O. Box 10 11 61  
69451 Weinheim  
Germany  
Phone +49 (0) 6201–606-147  
Fax +49 (0) 6201–606-172  
e-mail: [angewandte@wiley-vch.de](mailto:angewandte@wiley-vch.de)  
[www.angewandte.org](http://www.angewandte.org)

21602103\_BW

 **WILEY-VCH**